

**Analyse der Rolle des Hedgehog-Signalweges
im hämatopoetischen System
mit Hilfe von transgenen Smoothened-Mausmodellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät
Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Jennifer Galow
aus Mülheim an der Ruhr

April 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Opalka
2. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Verena Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2010

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	15
1. Einleitung	17
1.1 Das hämatopoetische System	17
1.2 Der Hedgehog-Signalweg	21
1.3 Der Einfluss des Hedgehog-Signalweges auf die Hämatopoese und auf die Tumorentstehung	25
1.4 Das transgene Mausmodell	32
1.5 Zielsetzung	36
2. Material/Methoden	37
2.1 Chemikalien, Materialien und Geräte	37
2.1.1 chemische Substanzen	37
2.1.2 Materialien	38
2.1.3 Geräte	39
2.1.4 Lösungen und Puffer	39
2.1.5 Kits	40
2.1.6 Medien	40
2.2 Mäuse	41
2.2.1 Haltung, Behandlung, Organentnahme	50
2.2.2 Blutbilder	52
2.3 Genotypisierung	52
2.3.1 DNA-Isolierung aus Gewebe und Einzelzellsuspensionen	53
2.3.2 PCR	55
2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA	56
2.4 Nachweis Cre-vermittelter Rekombinationen	57
2.4.1 DNA-Gelextraktion	57
2.4.2 DNA-Sequenzierung	57
2.5 mRNA-Expressionsnachweise	58

2.5.1	RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe	59
2.5.2	cDNA-Generierung	59
2.5.3	<i>real-time</i> RT-PCR (Applied Biosystems <i>Gene expression systems</i>)	60
2.6	Durchflusszytometrie	62
2.6.1	Oberflächenfärbung von Zellen	65
2.6.2	Titration, Isotypenkontrollen und Kompensation	69
2.7	<i>Colony Forming Cell (CFC)</i> -Assays	71
2.8	Gewebeschnitte	72
2.9	<i>ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay)</i> zum Nachweis von IgG2a	72
2.10	Konfokalmikroskopie (<i>Laser scanning microscopy</i>)	73
2.11	Statistik	75
3.	Ergebnisse	76
3.1	Genotypisierung transgener Mäuse	76
3.1.1	Genotypisierung der Tiere mit einem Hämatopoese-spezifischen <i>Smo-knockout</i>	78
3.1.2	Genotypisierung der SmoM2-transgenen Mäuse	81
3.2	Nachweis der rekombinierten transgenen Sequenzen	82
3.2.1	Nachweis der rekombinierten Smo-Allele	82
3.2.2	Nachweis des rekombinierten R26 ^{SmoM2} -Allels	91
3.2.3	Durchflusszytometrischer Nachweis des SmoM2-YFP-Proteins	100
3.3	Das hämatopoetische System in Smo-defizienten Tieren	102
3.3.1	Untersuchung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorpopulationen in Smo-defizienten Mäusen	103
3.3.2	Der Einfluss der Inaktivierung des Hh-Signalweges auf die Ausreifung myelo-erythrozytärer Zellen	111
3.3.3	B-Zellentwicklung in Smo-defizienten Mäusen	117
3.3.4	Inaktivierung des Hh-Signalweges in Thymozyten und in dem Thymusepithel	124

3.4	Konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges innerhalb der Hämatopoese	129
3.4.1	Einfluss der konstitutiven Aktivierung des Hh-Signalweges auf hämatopoetische Stammzellen und Progenitoren	131
3.4.2	Einfluss der SmoM2-Expression auf die terminale Ausreifung spezifischer hämatopoetischer Linien	135
3.4.3	Konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges in der Entwicklung der B-Lymphozyten	140
3.4.4	Entwicklung der T-Lymphozyten in SmoM2-transgenen Mäusen	149
4.	<u>Diskussion</u>	<u>155</u>
4.1	Experimenteller Ansatz und Methodik	155
4.2	Folgen der genetischen Smo-Manipulation auf hämatopoetische Stammzellen und Progenitoren	164
4.3	Folgen der genetischen Smo-Manipulation auf die Entwicklung von B- und T-Zellen	167
4.4	Einfluss der genetischen Smo-Manipulation auf myeloische Zellen	172
4.5	Funktionelle Abhängigkeit des Hh-Signalweges vom primären Zilium	174
5.	<u>Ausblick</u>	<u>176</u>
6.	<u>Zusammenfassung</u>	<u>178</u>
7.	<u>Anhang</u>	<u>179</u>
	Literaturverzeichnis	195
	Danksagung	209
	Lebenslauf	210
	Erklärung	212

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BCR	B-Zellrezeptor
BFU-E	<i>burst forming unit-erythroid</i>
bp	Basenpaare
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
Ca ²⁺	Kalzium
CFC	<i>colony forming cell</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CFU-E	<i>colony forming unit-erythroid</i>
CFU-G	<i>colony forming unit-granulocyte</i>
CFU-M	<i>colony forming unit-monocyte</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
Cre	Cre-Rekombinase
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErP	<i>erythrocyte progenitor</i>
EthBr	Ethidiumbromid
Ex	Exon
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FA	Formaldehyd
FCS	fötales Kälberserum
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Keimzentrum
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
HCl	Salzsäure
HSC	hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
Int	Intron
i.p.	intra peritoneal
kb	Kilobasen
Laser	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
MEP	<i>megacaryocyte erythrocyte progenitor</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minuten
mind.	mindestens
MkP	<i>megacaryocyte progenitor</i>
ml	Milliliter
MPP	multipotenter Progenitor
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEO ^R	Neomycin-Resistenz-Kassette
ng	Nanogramm
NK	Natürliche-Killerzelle
NTC	<i>non template control</i>
OD	optische Dichte
pA	Polyadenylierungssignal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
PFA	Paraformaldehyd

PGK	Phosphoglyceratkinase
PI	Propidiumiodid
pIpC	<i>polyinosine polycytidylic acid</i>
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>round per minute</i>
RT	Reverse-Transkriptase
SCL	<i>stem cell leukaemia</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
SSC	<i>side scatter</i>
TAM	Tamoxifen
TCR	T-Zellrezeptor
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z. B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb.1.1: Das hierarchische Modell der Hämatopoese.	18
Abb.1.2: Der kanonische Hh-Signalweg.	22
Abb.1.3: Das Cre/loxP-System.	34
Abb.2.1: Schematische Darstellung des Smo^{Null}-Allels im Vergleich zum Smo^{wt}-Allel.	41
Abb.2.2: Schematische Darstellung des Smo^{loxP}-Allels und des rekombinierten Smo^{loxP}-Allels im Vergleich zum Smo^{wt}-Allel.	42
Abb.2.3: Schematische Darstellung des $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$-Allels und des rekombinierten $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$-Allels im Vergleich zum R26^{wt}-Allel.	44
Abb.2.4: Schematische Darstellung des R26^{EYFP}-Allels und des Cre-rekombinierten R26^{EYFP}-Allels im Vergleich zum R26^{wt}-Allel.	44
Abb.2.5: Schematische Darstellung der Aktivität Hämatopoese-spezifischer Cre-Rekombinasen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien, definitiver HSC und exemplarischer Ausdifferenzierung in B-Zellen.	45
Abb.2.6: Schematische Darstellung des (A) HSC-SCL-Cre-ER^T-Konstruktes und (B) der Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen.	47
Abb.2.7: Schematische Darstellung des Vav-iCre-Konstruktes.	48
Abb.2.8: Schematische Darstellung des CD19^{Cre}-Allels im Vergleich zum CD19^{wt}-Allel.	48
Abb.2.9: Schematische Darstellung des $\text{Foxn1}^{\text{Cre}}$-Allels im Vergleich zum Foxn1^{wt}-Allel.	49
Abb.2.10: Schematische Darstellung des Col2-Gal4- und UAS-Ihh-Konstruktes.	50
Abb.2.11: Schematische Darstellung eines TaqMan-Systems.	61

Abb.2.12: Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflusszytometers.	63
Abb.2.13: FSC/SSC Kontur-Plot-Auftragung der Signale von Knochenmarkzellen einer Wildtyp-Maus.	64
Abb.2.14: Kontur-Plot-Darstellung von Knochenmarkzellen und der negativen Selektion einer Population am Beispiel der sogenannten Linien-Färbung.	69
Abb.2.15: Titration eines Fluorochrom-markierten Antikörpers.	70
Abb.3.1: Beispiel eines Kreuzungsschemas für die Generierung von <i>Smo-knockout</i>-Tieren.	77
Abb.3.2: Schematische Darstellung der verwendeten <i>Smo-Loki</i>.	79
Abb.3.3: Nachweis der unterschiedlichen <i>Smo</i>-Allele durch PCR-Analyse.	80
Abb.3.4: Nachweis der <i>Vav-iCre</i>- und <i>Cre</i>-Rekombinase-Sequenz durch PCR-Analyse.	80
Abb.3.5: Nachweis des $R26^{SmoM2}$-Allels durch PCR-Analyse.	82
Abb.3.6: Schematische Darstellung des rekombinierten Smo^{loxP}-Allels vor und nach erfolgter Rekombination.	83
Abb.3.7: Schematische Darstellung des Smo^{wt}-Lokus und der verwendeten Primer zur Detektion des <i>Smo</i>-Exon 1 und 2 mittels PCR-Analyse.	84
Abb.3.8: Rekombinationsnachweis des Smo^{loxP}-Allels durch PCR-Analyse auf genomischer DNA- und mRNA-Ebene.	85
Abb.3.9: Rekombinationsnachweis des Smo^{loxP}-Allels durch PCR-Analyse auf genomischer DNA- und mRNA-Ebene.	87
Abb.3.10: RT-PCR-Analyse des <i>Smo</i>-Exon 11-12.	88
Abb.3.11: Rekombinationsnachweis des Smo^{loxP}-Allels durch PCR-Analyse.	89

Abb.3.12: Kontur-Plot (FlowJo-Programm)-Darstellung des CD19-Markers auf den B-Zellen der Milz von CD19-Cre-<i>knockin</i> Mäusen und Kontrolltieren.	90
Abb.3.13: Rekombinationsnachweis des Smo^{loxP}-Allels durch PCR-Analyse.	91
Abb.3.14: PCR-Strategien zum Nachweis des rekombinierten $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$-Allels und der SmoM2-Expression in Knochenmarkzellen.	93
Abb.3.15: PCR-Nachweise der Rekombination des $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$-Allels und der SmoM2-Expression in Knochenmarkzellen.	95
Abb.3.16: Exemplarische HE-Färbung des Gehirns und des Kleinhirns (Cerebellum) von Vav-iCre;$\text{R26}^{\text{SmoM2}}$- und Kontrolltieren.	96
Abb.3.17: Rekombinationsnachweis des $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$-Allels mittels PCR-Analyse in Knochenmark und Milz von CD19-Cre;$\text{R26}^{\text{SmoM2}}$- und Kontrolltieren.	98
Abb.3.18: Rekombinationsnachweis des $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$-Allels mittels PCR-Analyse im Thymusstroma.	99
Abb.3.19: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Hautschnitten von Foxn1-Cre;$\text{R26}^{\text{SmoM2}}$-Tieren und Kontrollen.	100
Abb.3.20: Durchflusszytometrischer Nachweis der SmoM2-Expression.	101
Abb.3.21: Gesamtzellzahl der Organe Thymus, Knochenmark und Milz von Vav-iCre;$\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$-Mäusen und Kontrolltieren.	103
Abb.3.22: Schematische Darstellung der <i>gating</i>-Strategie zur durchflusszytometrischen Identifikation von hämatopoetischen Stammzellen und Progenitoren, die in Abb.3.23 verwendet wurde.	105
Abb.3.23: Durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Stammzell- und Progenitorpopulationen im Knochenmark von TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;$\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$- und konstitutiven Vav-iCre;$\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$- Mäusen.	107
Abb.3.24: Expressionsnachweis der Hh-Zielgene Ptch und Gli1 durch RT-PCR-Analyse in Knochenmarkzellen der Vav-iCre;$\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$-Tiere und Kontrolltiere.	108

Abb.3.25: Real-time RT-PCR-Analyse der Hh-Zielgene Ptch und BMP4 sowie der Hh-Signalweg-Komponente Smo aus der cDNA der Knochenmarkszellen der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere.	110
Abb.3.26: Durchflusszytometrischer Nachweis der granulo-monozytären Zellen im Knochenmark.	112
Abb.3.27: Durchflusszytometrische Analyse der Erythropoese im Knochenmark der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- Mäuse.	113
Abb.3.28: Colony-Assays von erythrozytären Progenitoren im Knochenmark.	115
Abb.3.29: RT-PCR-Analyse der Expression der Hh-Zielgene Gli1 und Ptch aus der cDNA der Milz- und Knochenmarkszellen von CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tieren und der Kontrolltiere.	118
Abb.3.30: Durchflusszytometrische Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) und graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der B-Zellentwicklung im Knochenmark der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- und CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere sowie der jeweiligen Kontrollen.	119
Abb.3.31: Durchflusszytometrische Analyse (FlowJo-Software) und graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der reifen B-Zellpopulationen in der Milz von CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere sowie der Kontrolltiere.	120
Abb.3.32: Durchflusszytometrische Analyse der Plasmazellen des Knochenmarks der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle.	121
Abb.3.33: Nachweis von Sekundärfollikeln in Smo-defizienten Mäusen.	123
Abb.3.34: IgG2a-Nachweis mittels ELISA aus dem Blutserum von CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}- und Kontrolltieren.	124
Abb.3.35: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus.	125
Abb.3.36: Expressionsquantifizierung der Hh-Zielgene Ptch, Gli1 und BMP4 sowie der Hh-Komponente Smo in den Zellen des Thymusstromas der	127

Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}- und Kontrolltiere durch *real-time* RT-PCR-Analyse.

Abb.3.37: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellentwicklung unter dem Einfluss eines Hämatopoese- und Thymusepithel-spezifischen Smo-*knockout*. 128

Abb.3.38: Gesamtzellzahl der Organe Thymus, Knochenmark und Milz von Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäusen und Kontrolltieren. 132

Abb.3.39: Durchflusszytometrische Analyse der HCSs, GMPs, CMPs, und MEPs im Knochenmark der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse. 133

Abb.3.40: Expressionsnachweis durch RT-PCR-Analyse der Hh-Zielgene Ptch und Gli1 im Knochenmark der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere und Kontrolltiere. 134

Abb.3.41: Expressionsquantifizierung der Hh-Zielgene Ptch und BMP4 sowie der Hh-Komponente Smo in den Zellen des Knochenmarks der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere durch *real-time* RT-PCR-Analyse. 135

Abb.3.42: Durchflusszytometrische Analyse granulo-monozytärer Vorläufer und Megakaryozyten sowie NK-Zellen. 137

Abb.3.43: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen Erythrozyten im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse. 138

Abb.3.44: *Colony-Assay*-Analyse. 139

Abb.3.45: Das Col2-Gal4;UAS-Ihh-System. 142

Abb.3.46: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen B-Zellen im Knochenmark, der fötalen Leber und der Milz von Col2-Gal4;UAS-Ihh-Embryonen an Tag E18,5 und Kontrolltieren. 144

Abb.3.47: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen B-Lymphozyten im Knochenmark und der Milz transgener CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere und Kontrolltiere. 146

Abb.3.48: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen B-Lymphozyten im Knochenmark und der Milz transgener CD19-Cre;R26^{SmoM2/wt}-Tiere und der Kontrolltiere.	147
Abb.3.49: Durchflusszytometrische Analyse der Plasmazellen im Knochenmark der CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere und der Kontrolltiere.	148
Abb.3.50: Exemplarische HE-Färbung eines Milz-Paraffinschnittes einer CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Maus und einer Wildtyp-Kontrollmaus.	149
Abb.3.51: Graphische Darstellung der IgG2a-Konzentration aus dem Blutserum transgener CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere und der Kontrolltiere.	150
Abb.3.52: Schematische Darstellung der Thymozyten- und Thymusepithel-spezifischen Expression des SmoM2-Rezeptors.	151
Abb.3.53: Expressionsquantifizierung durch real-time RT-PCR-Analyse der Hh-Zielgene Ptch, Gli1 und BMP4 sowie der Hh-Komponente Smo im Thymusepithel der Foxn1-Cre;R26SmoM2-Tiere und Kontrolltiere.	152
Abb.3.54: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellkompartimente des Thymus.	153
Abb.7.1: Durchflusszytometrischer Nachweis des Smo-Proteins auf DN2-Thymozyten im Thymus und B220⁺ sowie B220⁻ Zellen in der Milz einer Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Maus und einer Wildtyp-Kontrolle.	193
Abb.7.2: Detektion des SmoM2-YFP-Fusionsproteins mittels LSM (engl.: <i>laser scanning microscopy</i>) in B-Lymphozyten.	194

Tabellenverzeichnis	Seite
Tab.2.1: Tabellarische Zusammenstellung einer Fluorochrom-Kombination, die für eine Zellfärbung verwendet und mit dem LSR II-Durchflusszytometer analysiert werden kann.	65
Tab.2.2: In der Durchflusszytometrie relevante Oberflächenphänotypen unterschiedlicher Zellkompartimente.	66
Tab.3.1: Genotyp-Verhältnis der F2-Generation bei der Zucht von Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäusen.	102
Tab.3.2: Blutbilduntersuchung mittels VetABC der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null} - und Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Systeme.	116
Tab.3.3: Genotyp-Verhältnis bei der Zucht von Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäusen.	131
Tab.3.4: Blutbilduntersuchung durch VetABC-Analyse der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse.	140
Tab.7.1: Mausstämme	179
Tab.7.2: Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere	180
Tab.7.3: Primer zum Nachweis der Cre-abhängigen Rekombination	181
Tab.7.4: Primer für die verwendeten Expressionsanalyse	181
Tab.7.5: TaqMan[®] Assays (Applied Biosystems) zum Nachweis der Hh-Zielgene und Smo	182
Tab.7.6: Antikörper, Isotypenkontrollen, <i>Blocking</i>-Reagenzien und fluoreszenzmarkierten Proteine	182
Tab.7.7: Fluorochromkonjugate und Metabolit-Fluorochrome	183
Tab.7.8: PCR-Protokoll zum Nachweis einer Sequenz des SCL-Lokus	184

Tab.7.9: PCR-Protokoll zum Nachweis einer Sequenz des Cre-Transgens	185
Tab.7.10: PCR-Protokoll zum Nachweis einer Sequenz des Vav-iCre-Transgens	185
Tab.7.11: PCR-Protokoll zum Nachweis des transgenen und Wildtyp-R26-Allels	186
Tab.7.12: PCR-Protokoll zum Nachweis des Smo^{Null}-Allels	187
Tab.7.13: PCR-Protokoll zum Nachweis des intakten und rekombinierten Smo^{loxP}-Allels	187
Tab.7.14: PCR-Protokoll zum Nachweis des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels	188
Tab.7.15: PCR-Protokoll zum Nachweis des Ptch^{Null}-Allels	189
Tab.7.16: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis des <i>house keeping</i>-Gens HPRT	190
Tab.7.17: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis der Hh-Komponente Smo-Exon 1-2	190
Tab.7.18: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis der Hh-Komponente Smo-Exon 11-12	191
Tab.7.19: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis des Hh-Zielgens Gli1	192
Tab.7.20: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis des SmoM2-Transkriptes	192

1. Einleitung

1.1 Das hämatopoetische System

Die Entwicklung der ersten Blutzellen (Hämatopoese) erfolgt im Mausembryo in mehreren Stufen und findet an unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb des Embryos statt. Die ersten Zellen der primitiven Hämatopoese entstehen am Tag E7,5 (Tag 7,5 der embryonalen Mausentwicklung, die Gestationsdauer der Maus beträgt 20 bis 21 Tage) in den Blutinseln des Dottersacks (Moore and Metcalf, 1970). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die ersten Zellen der definitiven Hämatopoese aus „hämogenen Endothel“ differenzieren. Dies sind spezialisierte Endothelzellen, die in den Nabel- und Dottersackarterien und im Dottersack lokalisiert sind (Chen et al., 2009; Eilken et al., 2009; Lancrin et al., 2009). Ab E10 der Ontogenese besiedeln die ersten definitiven hämatopoetischen Stammzellen (HSC; engl.: *hematopoietic stem cell*) die fötale Leber, die während des zweiten Abschnitts der Gestation Hauptort der Blutbildung ist. Ab E16 der Mausentwicklung besiedeln die HSC über das Kreislaufsystem das Knochenmark, das im adulten Organismus Sitz der Hämatopoese und somit primärer Entstehungsort aller Blutzellen ist (Durand and Dzierzak, 2005).

Das Blut setzt sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen. Diese zellulären Komponenten können lichtmikroskopisch in Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und in Erythrozyten (rote Blutkörperchen) unterteilt werden. Weiterhin sind als kleinere Partikel die Thrombozyten (Blutplättchen) zu identifizieren. Entwicklungsbiologisch werden die Leukozyten in die myeloische und die lymphatische Zelllinie (engl.: *lineages*) unterteilt (Reya et al., 2001). Zur lymphatischen Linie werden alle Formen der T-Lymphozyten, wie die zytotoxischen, T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen gerechnet. B-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen werden ebenfalls der lymphatischen Linie zugeordnet. Aus der myeloischen Entwicklungslinie gehen Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Megakaryozyten und Erythrozyten hervor (Abb.1.1).

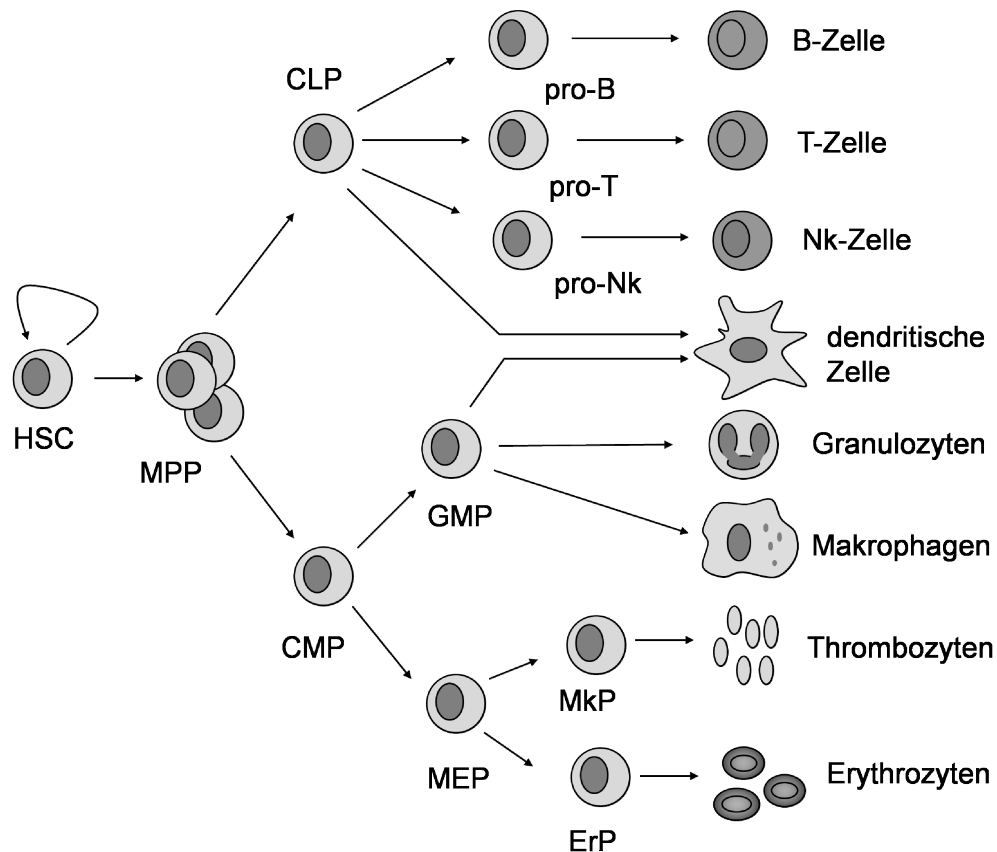


Abb.1.1: Das hierarchische Modell der Hämatopoese. Selbsterneuernde hämatopoetische Stammzellen sind Ursprung aller multipotenten hämatopoetischen Progenitorzellen (MPP). Auf die multipotenten Progenitoren folgen oligopotente Progenitoren, welche zu den unterschiedlichen reifen Formen der Blutzellen ausdifferenzieren. HSC, engl.: *hematopoietic stem cell*; CMP, engl.: *common myeloid progenitor*; GMP, engl.: *granulocyte-monocyte progenitor*; CLP, engl.: *common lymphoid progenitor*; MEP, engl.: *megacaryocyte-erythrocyte progenitor*; MkP, engl.: *megacaryocyte progenitor*; ErP, engl.: *erythrocyte progenitor* [nach (Bryder et al., 2006)].

Die Funktion der lymphatischen und der myeloischen Zellen stellt die Aufrechterhaltung der humoralen und zellulären Immunabwehr dar. Die Hauptfunktion der kernlosen Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff in die verschiedenen Gewebe. Innerhalb der Erythrozyten wird der Sauerstoff an Hämoglobin gebunden. Die ebenfalls kernfreien Thrombozyten sind maßgeblich an der Blutgerinnung beteiligt und dienen dem Verschluss vaskulärer Läsionen. Alle aufgeführten reifen hämatopoetischen Zellen entstehen im Knochenmark adulter Vertebraten aus einer kleinen Population hämatopoetischer Stammzellen. Diese adulten Stammzellen sind in der Lage sich über die gesamte Lebensdauer des Organismus selbst zu erhalten und sich durch Teilung sowohl selbst zu erneuern, als auch Zellen hervorzubringen, die eine von der Mutterzelle unterschiedliche Entwicklung durchlaufen. Dieser Prozess wird als asymmetrische

Zellteilung bezeichnet. Die resultierenden reiferen Vorläuferzellen sind sogenannte multipotente Progenitoren. Die Hauptfunktion von Progenitoren ist die Zellzahlen und Anteile der unterschiedlichen Zelltypen des Blutes in Homöostase zu halten. Der kontinuierliche Nachschub neu gebildeter Zellen gewährleistet Ersatz für gealterte und abgebaute Zellen (Bellantuono, 2004; Ogawa, 1993). Dies bedeutet, dass das Zellkompartiment der Stammzellen in der Lage sein muss, bei gesteigertem Bedarf seine Aktivität hochzuregulieren. Der kontinuierliche Erhalt des vollständigen Blutsystems sowie die Anpassung an gegebene Umstände (Verletzungen, schädliche Umwelteinflüsse oder pathologische Prozesse und Alterung) unterliegen strengen Kontrollmechanismen, die die Aktivität der HSC regulieren und beeinflussen. Bis heute sind die regulatorischen Mechanismen, die die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung von HSC bedingen, noch nicht vollständig aufgeklärt.

In den vergangenen Jahren wurden zellintrinsische, den Zellen innewohnende regulative Mechanismen, und auch extrinsische, auf die Zelle einwirkende molekulare Regulatoren, der Selbsterneuerung identifiziert. Zellintrinsische Signale, die als Regulatoren der HSC dienen, sind Transkriptionsfaktoren wie Gfi-1, Tel und Bmi-1 (Hock et al., 2004; Lessard and Sauvageau, 2003; Zeng et al., 2004) oder auch der Zellzyklusregulator p21 (Cheng et al., 2000). Zudem konnten das Proto-Onkogen Myc, die DNMT1 (DNA-Methyltransferase 1) und das Tumorsuppressor-Protein p53 als intrinsische Signale identifiziert werden, die die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der HSC beeinflussen (Broske et al., 2009; Laurenti et al., 2008; Liu et al., 2009), um nur einige Beispiele zu nennen.

Extrinsische Signale werden durch Faktoren vermittelt, die vornehmlich in einem räumlich eng begrenzten Kontext von Stammzellen lokalisiert sind. Die extrinsischen Einflüsse auf HSC werden durch das Modell der sogenannten Stammzellnische beschrieben. Die Stammzellnische ist ein definiertes Umfeld (engl.: *microenvironment*) im Knochenmark, das aus Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen, extrazellulären Matrixkomponenten und löslichen Faktoren besteht. Zum einen stützt dieses Umfeld HSC anatomisch, zum anderen werden Signale vermittelt, die der Stammzelle ermöglichen, ihre besonderen Eigenschaften zu erhalten. Osteoblasten, die an der Bildung der Stammzellnische beteiligt sind (Calvi et al., 2003), interagieren auf der Oberfläche der

Knochenmatrix mit den HSC und regulieren die Größe der Stammzellpopulation (Zhang et al., 2003). Die Interaktion zwischen HSC und Osteoblasten verstärkt die Selbsterneuerungsfähigkeit der Stammzellen und dient dem Erhalt der Nische. Ein Beispiel für extrinsische Faktoren sind die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 und sein Ligand Angiopoetin-1 (Arai et al., 2004). Weitere extrinsische Faktoren stellen das Hormon Prostaglandin E2 und das Zytokin Interferon-alpha (INF α) dar (North et al., 2007; Matsuoka et al., 2008; Essers et al., 2009).

Die Fähigkeit zur Rekonstitution eines vollständigen hämatopoetischen Systems ist eine besondere funktionelle Eigenschaft von HSC. Diese Eigenschaft ermöglicht die Transplantation von Knochenmarkzellen und hat sich im Rahmen der Therapie hämatologischer Erkrankungen zu einer unentbehrlichen therapeutischen Option entwickelt. Die Identifikation extrazellulärer Regulatoren der Selbsterneuerung hat zum Ziel, die Expansion hämatopoetischer Stammzellen *ex vivo* zu ermöglichen und das Verfahren der Transplantation effizienter zu gestalten.

Besondere Aufmerksamkeit wurde in diesem Zusammenhang auf die Morphogen-Signalwege von Notch und Wnt gerichtet, die eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielen. Sowohl Notch als auch Wnt steuern die Organogenese und das Zellschicksal während der Entwicklung. Morphogene sind sezernierte Faktoren, die durch Ausbildung eines Konzentrationsgradienten die Entwicklung einzelner Zellen und damit auch ganzer Gewebe beeinflussen. Die individuelle Dosierung des Morphogens ist für die Antwort der Zielzelle von großer Bedeutung. Die Notch- und Wnt-Signalwege spielen eine funktionelle Rolle für die Selbsterneuerung von Stammzellen (Hitoshi et al., 2004; Korinek et al., 1998). Dies konnte insbesondere auch für HSC nachgewiesen werden (Murdoch et al., 2003; Reya et al., 2003; Stier et al., 2002; Varnum-Finney et al., 2000; Willert et al., 2003). Beide Signalwege sind essentielle Komponenten der Stammzellnische im Knochenmark und in direkter Kooperation wichtig für den Erhalt der HSC (Duncan et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Defizienz für Wnt3a in der Reduktion hämatopoetischer Stammzellen resultiert (Luis et al., 2009).

Als weitere funktionell wichtige Morphogen-Kaskade ist der Hedgehog (Hh)-Signalweg bekannt. Zu Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit war die Rolle des Hh-Signalweges für die Regulation von HSC und der Hämatopoese *in*

vivo weitgehend unerforscht. Deshalb war Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss des Hh-Signalweges auf die Funktion von HSC, auf die Entwicklung unterschiedlicher Progenitoren und auf die Ausreifung der hämatopoetischen Linien zu untersuchen.

1.2 Der Hedgehog-Signalweg

Der Ursprung der Bezeichnung *hedgehog* (dt.: „Igel“) beruht auf Beobachtungen von Nüsslein-Volhard und Wieschaus (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Im Rahmen ihrer Arbeit über die frühe Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* entdeckten Nüsslein-Volhard und Wieschaus eine igelartige Larve und benannten das entsprechend mutierte Protein nach dem beobachteten Phänotyp *hedgehog*. Das Hedgehog (Hh)-Protein ist der Ligand des nach ihm benannten Signalweges. Hh kontrolliert bei *Drosophila* die Polarität (anterior-posterior) der segmentierten Körperachse sowie die Flügelbildung des Insekts. In Vertebraten induziert Hh die Rechts-/ Links-Symmetrie und ist für die korrekte Ausbildung der Gliedmaßenanlagen verantwortlich.

Nach der Identifikation des Hh-Liganden in *Drosophila* wurden in vielen weiteren Invertebraten orthologe Hh-Gene entdeckt, u.a. in *Hirudo medicinalis* (Blutegel) und *Diadema antillarum* (Seeigel) (Chang et al., 1994; Inoue et al., 2002; Shimeld, 1999). Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) weist hingegen keine Hh-orthologen Gene auf. Jedoch besitzt dieser Wurm einige Proteinomologe zu dem Hh-Rezeptor Patched (Ptch) (Kuwabara et al., 2000).

In *Mus musculus* (Maus), *Danio rerio* (Zebrafisch) und *Homo sapiens* (Mensch) waren ebenfalls Hh-Orthologe nachzuweisen (Chang et al., 1994; Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Riddle et al., 1993). In Vertebraten existieren drei Formen des Hh-Gens: Desert Hedgehog (Dhh), Indian Hedgehog (Ihh) und Sonic Hedgehog (Shh) (Echelard et al., 1993). Zwischen Ihh und Shh besteht eine nahe Verwandtschaft.

Die an der Signalkaskade beteiligten Schlüsselkomponenten des Hh-Signalweges liegen bei Invertebraten und Vertebraten konserviert vor. Hh bindet an den Transmembranrezeptor Patched (Ptch), das die Aktivierung des zweiten Transmembran-rezeptors Smoothed (Smo) und des Weiteren eines Zinkfingertranskriptionsfaktors (Ci in *Drosophila*, Gli1-3 in Säugern) zur Folge hat

und in der Expression spezifischer Zielgene resultiert (Huangfu and Anderson, 2006; Jacob and Lum, 2007; Varjosalo and Taipale, 2007). Der Hauptunterschied im Hh-Signalweg zwischen Säugetieren und Drosophila ist das Vorliegen multipler Orthologe von Hh, Ptch und Ci bei den Säugern im Vergleich zu Drosophila.

Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich auf den Hh-Signalweg des Menschen und der Maus bezieht, wird im Folgenden näher auf die Signalkaskade der Vertebraten eingegangen (Abb.1.2).

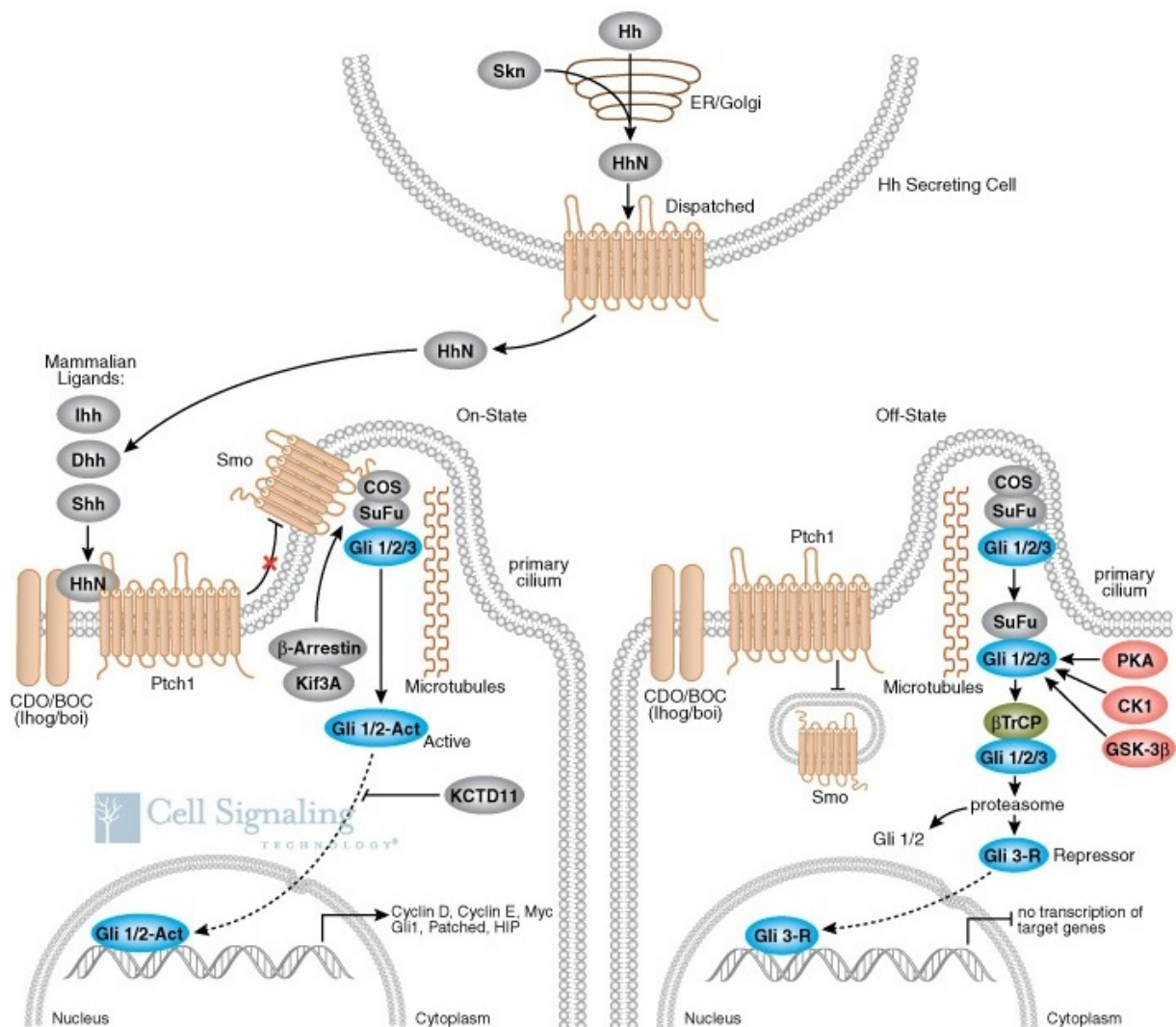


Abb.1.2: Der kanonische Hh-Signalweg. Der sezernierte und aktivierte Hh-Ligand bindet den Transmembranrezeptor Ptch, wodurch die Inhibition des zweiten Rezeptors Smo aufgehoben und die Signalkaskade über die Gli-Transkriptionsfaktoren bis zur Expression bestimmter Zielgene weitergeführt wird (<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Hedgehog.html>). HhN, aktivierter *hedgehog*-Ligand; Ihh, engl.: *indian hedgehog*; Dhh, engl.: *desert hedgehog*; Shh, engl.: *sonic hedgehog*; Ptch1, engl.: *patched 1*; Cdo, engl.: *cell adhesion molecule related / down regulated by oncogenes*; Boc, engl.: *brother of Cdo*; Smo, engl.: *smoothened*; COS, engl.: *Costal 2*; SuFu, engl.:

suppressor of Fused; Gli, *glioblastoma associated*-Transkriptionsfaktoren; -Act, Aktivator; -R, Repressor; Kif3A, engl.: *kinesin-II motor subunit*; PKA, Proteinkinase A; CK1, Kreatinkinase 1; GSK-3 β , Glykogensynthase-Kinase 3 β ; β TrCP, Ubiquitin-E3-Ligase.

Nach erfolgreicher Translation des Proteins durchlaufen alle drei Hh-Unterformen diverse Prozessierungsschritte, die für die Generierung eines aktiven Liganden und der anschließenden Sekretion von Bedeutung sind.

Durch die autokatalytische C-terminale Domäne spaltet sich das primäre Hh-Protein unter der Beteiligung eines Cholesterins zwischen konservierten Glycin- und Cystein-Resten (Lee et al., 1994; Porter et al., 1996). Das primäre Hh-Protein liegt anschließend in zwei Teile getrennt vor. Es entsteht ein C-terminales Polypeptid ohne weitere bekannte Funktion und ein N-terminales Hh-Polypeptid (HhN), das einen Cholesterin-modifizierten C-Terminus besitzt (Porter et al., 1996). Im Folgenden wird der N-Terminus des HhN mit einem Palmitinsäurerest (Pepinsky et al., 1998) assoziiert (Lee et al., 2001). Die vollständige Aktivierung des Hh-Moleküls ist erst nach erfolgreicher Modifikation beider Termini abgeschlossen.

Die anschließende Hh-Sekretion benötigt das 12-Pfad-Transmembranprotein Dispatched (Disp), das wie Ptch der Familie der RND (engl.: *resistance nodulation division*)-Transportproteinen angehört.

Der Hh-Ligand ist in der Lage über eine weite Distanz, bis zu 300 μ m in den Gliedmaßenknospungen, zu agieren (Zhu and Scott, 2004). An diesem Prozess sind Heparansulfat-assoziierte Proteoglykane beteiligt (Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004; Koziel et al., 2004). Auf der Oberfläche der Zielzelle unterstützen die Transmembranproteine Cdo (engl.: *cell adhesion molecule related / down regulated by oncogenes*) und Boc (engl.: *brother of Cdo*) die Assoziation von Hh an Ptch (Tenzen et al., 2006), indem die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor verstärkt wird (Yao et al., 2006; Tenzen et al., 2006). Auf den Zelloberflächen der Vertebraten befinden sich zusätzliche Hh-bindende Transmembranproteine wie HIP (engl.: *hedgehog interacting protein*). Die Expression von HIP und auch von Ptch wird durch den Hh-Signalweg aktiviert und führt zu einer negativen Rückkopplung (engl.: *feedback loop*) des Hh-Signalweges. Die Rückkopplung ist negativ, da HIP Hh aus der extrazellulären Matrix abfängt und somit seine fortlaufende Bewegung im Gewebe reduziert (Chuang and McMahon, 1999; Jeong and McMahon, 2005) und Ptch Hh bindet

und internalisiert (Chen and Struhl, 1996; Gallet and Therond, 2005; Incardona et al., 2000). Auch die Expression von Cdo und Boc wird durch die Aktivierung des Hh-Signalweges beeinflusst. Als Antwort auf das Hh-Signal werden die Cdo und Boc Expressionsniveaus heruntergeregelt, was sich negativ auf die Bindung des Liganden an die Zielzelle auswirkt.

In der Abwesenheit eines Hh-Liganden inhibiert der Ptch-Rezeptor die Aktivität des 7-Pfad-Transmembranproteins Smoothened (Smo) (Taipale et al., 2002). Sobald Hh an Ptch bindet, wird die Repression aufgehoben und Smo aktiviert. Des Weiteren wird das Signal über die Gli (engl.: *glioblastoma associated*)-Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma zum Nukleus der Zelle weitergeleitet. Der genaue Mechanismus der Gli-Aktivierung durch Smo ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Für die erfolgreiche Weiterleitung des Hh-Signals wird das primäre Zilium benötigt. Dieses Organell stülpt sich aus der Oberfläche vertebraler Zellen hervor. Smo akkumuliert im primären Zilium als Antwort auf fehlende Ptch-Inhibition durch Hh (Corbit et al., 2005). Ohne Hh-Aktivierung wird die Translokation von Smo in das primäre Zilium durch den Einfluss von Ptch verhindert (Rohatgi et al., 2007).

Es sind diverse Proteine an der Ausbildung des Ziliums, und weitere wie z. B. Su[Fu] (engl.: *suppressor of fused*) oder die Proteinkinase PKC δ an dem anschließenden Signalprozess beteiligt (Haycraft et al., 2005).

Die unterschiedlichen Gli-Transkriptionsfaktoren besitzen transkriptionelle Aktivator- und auch Repressorfunktionen. In Anwesenheit von Hh bewirken Gli1 und Gli2 eine transkriptionelle Aktivierung definierter Targetgene (Bai and Joyner, 2001). Im Gegensatz dazu ist Gli3 in Ab- und in Anwesenheit von Hh funktionsfähig. In Abwesenheit von Hh liegt Gli3 phosphoryliert vor, was eine proteolytische Spaltung von Gli3 durch die Ubiquitin E3 Ligase β -TrCP zu Folge hat. Durch diese Spaltung wird Gli3 zu einer verkürzten Repressorform (Gli3-R) prozessiert (Wang et al., 2000; Pan et al., 2006). In Anwesenheit des Hh-Signals bleibt die ungespaltene Form von Gli3 erhalten und der Faktor agiert als Aktivator (Gli3-A). Gli3 ist demnach ein bifunktioneller Regulator der Transkription.

Gli2 wird ebenfalls einer Protein-Prozessierung unterzogen (Pan et al., 2006). Jedoch ist nicht vollständig geklärt, ob dieser Prozess in der Generierung eines verkürzten Repressors oder in der Degradation des Proteins resultiert.

Für den positiven *feedback loop* des Hh-Signalweges ist Gli1 verantwortlich, da das Gli1-Gen selbst ein transkriptionelles Ziel des Hh-Signalweges darstellt.

Zu den Zielgenen des Hh-Signalweges zählen die Zellzyklusregulatoren Cyclin D und E, der Anti-Apoptosefaktor bcl-2 und mehrere Homöobox (Hox)-Transkriptionsfaktoren (Bigelow et al., 2004; Duman-Scheel et al., 2002; Kato et al., 2001). Weitere wichtige Zielgene sind BMP4 und Myc. Die Proteine Myc und BMP4 spielen zudem eine wichtige Rolle in der Hämatopoese (Perry et al., 2007; Bonifas et al., 2001; Chen et al., 1997). Wie bereits erwähnt, wird auch die Expression der Gene der Hh-Kaskadenkomponenten Ptch, HIP und Gli1 reguliert. Die Vielzahl der Hh-Zielgene spiegelt die vielfältige Funktion des Hh-Signalweges in unterschiedlichen zellulären Kontexten wieder.

1.3 Der Einfluss des Hedgehog-Signalweges auf die Hämatopoese und auf die Tumorentstehung

Die Rolle des Hh-Signalweges in der frühen Hämatopoese

Die Bedeutung des Hh-Signalweges während der Hämatopoese wird durch zahlreiche Beobachtungen gestützt. Transgene Mäuse deren Hh-Signalweg durch die genetische Ausschaltung (engl.: *knockout*) des Smo-Rezeptors gestört ist, sind nicht lebensfähig, da während der Embryogenese die Links-/ Rechts-Achse des Tieres nicht ausgebildet wird. Auch die korrekte Ausbildung der Knochen ist in diesen Mutanten inhibiert. Shh- und auch Ihh-*knockout* Mäuse zeigen ähnliche Fehlbildungen (St-Jacques et al., 1999; Zhang et al., 2001).

Smo- und Ihh-defiziente embryonale Körperchen (engl.: *embryoid bodies* sind Zellaggregate, die aus embryonalen Stammzellen in Kultur entstehen) sind nicht in der Lage hämatopoetische Zellen auszubilden. Jedoch ist die primitive Dottersack-Hämatopoese in Smo- und Ihh-defizienten Embryonen vorhanden (Byrd et al., 2002). Aufgrund der frühen embryonalen Letalität von Ptch- (Milenkovic et al., 1999), Shh-, Ihh- und Smo-*knockout* Mausmutanten ist die Erforschung der adulten Hämatopoese mit Hilfe dieser ubiquitären *knockout*-Modelle nicht möglich. In Zebrafischen wurde für die Untersuchung der Hämatopoese das Gen syu (engl.: *sonic-you*) deletiert, das ebenfalls für Shh kodiert. Das Zebrafisch-Modell spricht dafür, dass der Hh-Signalweg in der adulten Hämatopoese eine

funktionelle Bedeutung besitzt. Ähnlich der murinen *knockout*-Daten konnte in diesem Zebrafisch-Modell nachgewiesen werden, dass die primitive Blutbildung unabhängig vom Hh-Signalweg ist (Gering and Patient, 2005).

Die zentralen Komponenten des Hh-Signalweges, Ptch und Smo, werden in murinen und humanen Stammzellen exprimiert (Akashi et al., 2003; Bhardwaj et al., 2001; Ivanova et al., 2002; Kobune et al., 2004), wobei die Expression des Smo-Proteins in unreifen murinen HSC höher als in reiferen Stammzellen war (Akashi et al., 2003; Ivanova et al., 2002). Diese Studien legen nahe, dass selbsterneuernde HSC ein hohes Niveau an Smo-Expression benötigen. Das Stroma des Knochenmarks exprimiert Ihh (Kobune et al., 2004). Diese Beobachtung stützt zusätzlich die Hypothese, dass der Hh-Signalweg ein regulierender Faktor der HSC-Nische des adulten Knochenmarks ist. Die Arbeiten von Bhardwaj *et al.* und Kobune *et al.* untersuchten die Auswirkungen der manipulierten Hh-Signalgebung auf die Funktion der HSC *in vitro*. Bhardwaj *et al.* zeigten, dass die Zytokin-induzierte Proliferation von humanen hämatopoetischen Progenitoren durch die Zugabe von Antikörpern gegen den humanen Shh- und Dhh-Liganden unterbunden werden konnte. Die Behandlung mit dem Shh-Protein hingegen führte zu einer Expansion der hämatopoetischen Vorläufer. Zusammenfassend sprechen diese beiden Studien dafür, dass der Hh-Signalweg für die Proliferation der HSC-Population ohne parallele Induktion der Differenzierung von funktioneller Bedeutung ist.

Die Rolle des Hh-Signalweges in der T-Zellentwicklung

Mehrere Arbeiten sprechen für eine Rolle des Hh-Signalweges auch während der Ausreifung verschiedener adulter hämatopoetischer Linien. Einige Studien untersuchten die Funktion des Hh-Signalweges in der T-Zellentwicklung. Die Entwicklung von T-Lymphozyten findet im Thymus statt. Ein früher Thymozytenvorläufer migriert vom Knochenmark in den Thymus, wo er in Antwort auf das ihn umgebene Umfeld und dessen Signaleinflüsse wie Notch (Radtke et al., 1999) und Wnt (Staal and Clevers, 2003) zu reifen beginnt. Die Differenzierung eines doppelt negativen (DN) Progenitors, der zu diesem Zeitpunkt weder den T-Zell-typischen funktionellen CD4, noch CD8 Korezeptor aufweist, kann in vier Entwicklungsstadien (DN1-4) unterteilt werden. Diese Unterteilung beruht im

murinen System auf der Oberflächenexpression von CD25 und CD44 (Zlotnik et al., 1992). Die DN-Stadien DN2/DN3 zeichnen sich durch die Ausbildung des vorläufigen T-Zellrezeptors durch genomisches Rearrangement aus (pre-TCR; engl.: *T cell receptor*). Dieser besteht aus dem CD3-Komplex, der mit der rearrangierten TCR β -Kette und der pre-TCR α -Kette assoziiert (von Boehmer H. and Fehling, 1997). Die sogenannte β -Selektion findet in den Stadien DN3/DN4 statt. Während der Entwicklung vom DN zum doppelt positiven (DP)-Thymozyten durchläuft der Progenitor ein Zwischenstadium, das des unreifen CD8⁺ ISP (engl.: *immature single positive*). Nachdem auch die TCR α -Kette in DP-Zellen rekombiniert wurde, wird ein TCR $\alpha\beta$ -Komplex auf der Oberfläche der DP-Zellen exprimiert. In der folgenden Positiv- und Negativselektion der DP-Zellen wird der T-Zellrezeptor auf seine Bindungseigenschaften geprüft. T-Zellen mit einer bestimmten T-Zellrezeptor-Affinität überleben diesen Prozess. Nach der Selektion wird der einfach positive (SP; engl.: *single positive*, CD4⁺ oder CD8⁺) reife T-Lymphozyt in die Peripherie entlassen. Unterschiedliche Arbeiten weisen auf die maßgebliche Beteiligung des Hh-Signalweges an der Differenzierung der Thymozyten hin. Alle entscheidenden Komponenten des Hh-Signalweges werden im Thymus exprimiert. Die Epithelzellen des Thymus und die unreifen DN-Thymozyten produzieren Shh, Ptch und Smo (Outram et al., 2000; Crompton et al., 2007). Der embryonale Thymus Shh-defizienter Mäuse wies eine verringerte Zellularität auf, die mit verringerter Proliferation der DN-Thymozyten und mit einer verminderten Differenzierung von DN1 nach DN2 verbunden war (Lowrey et al., 2002; Stewart et al., 2002).

Die Repression der Hh-Signaltransduktion durch die Expression des Gli2-Repressors (Gli2 Δ C2) in adulten Thymozyten der Maus resultierte jedoch in einer verstärkten TCR-abhängigen Proliferation und Aktivierung der T-Zellen (Rowbotham et al., 2008). Studien sprechen dafür, dass das Ihh-Signal im Thymus bifunktionell ist. Zum einen unterstützt das Ihh-Signal die Entwicklung der Thymozyten vor der Ausbildung des pre-TCR und zum anderen fungiert es als negativer Regulator nach diesem Entwicklungsschritt (Outram et al., 2009). Diese Daten implizieren, dass der Anstieg der Proliferation und Differenzierung während der T-Zellentwicklung und in reifen T-Lymphozyten durch das Hh-Protein gesteuert wird.

In *in-vitro*-Modellen der humanen T-Zellentwicklung wurde eine inhibierende Wirkung von Shh auf die Expansion CD34⁺ DN-Vorläufer und eine erhöhte Lebensfähigkeit durch die Hochregulation von bcl-2 beobachtet (Gutierrez-Frias et al., 2004).

Die Diskrepanz der verschiedenen Studien bezogen auf die einerseits fördernde und andererseits reprimierende Wirkung des Hh-Signals auf die Proliferation und Differenzierung lässt einen pleiotropen Effekt des Signalweges in den unterschiedlichen experimentellen Systemen vermuten. Weiterhin ist zu beachten, dass die beschriebenen Daten vornehmlich im Embryonalstadium erhoben wurden. Die embryonale T-Zellentwicklung unterscheidet sich maßgeblich von der Entwicklung der T-Zellen im adulten System.

Die Rolle des Hh-Signalweges in der B-Zellentwicklung

Frühe B-Lymphozyten-Vorläufer differenzieren zu reiferen Zellen, indem sie verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen, die durch das sequentielle Rearrangement der Immunoglobulin (Ig)-Genabschnitte definiert sind. Die genetische Umlagerung der Ig-Sequenzen dient der Generierung eines vielfältigen Repertoires von Antigen-Rezeptoren.

Die B-Zelllinienentwicklung beginnt mit der Differenzierung der pro-B-Zellen (definiert durch die Nomenklatur nach Hardy [(Allman et al., 1999; Hardy et al., 1991; Li et al., 1996): Fraktion A/B/C] aus CLP. In den initialen Schritten der B-Zellentwicklung findet das Rearrangement des Igh (schwere Kette)-Lokus mit der resultierenden Expression des pre-B-Zellrezeptors statt (Fraktion B/C). Ist das Rearrangement der schweren Kette auf einem Chromosom erfolgreich verlaufen, wird die Umlagerung der Gene auf dem anderen Chromosom unterdrückt. Dieser Prozess wird als allelische Exklusion bezeichnet. Wenn das Rearrangement des ersten Chromosoms keine funktionelle Kette hervorbringen konnte, schließt sich ein weiteres Rearrangement auf dem zweiten Chromosom an.

Die Signalgebung des pre-B-Zellrezeptor bewirkt den Übergang von einer pro- (Fraktion C) zu einer pre-B-Zelle (Fraktion C'). Anschließend proliferieren pre-B-Lymphozyten und erscheinen als große blastäre Zellen. Es folgt das Rearrangement des Leichtketten-Lokus. Die Umlagerung der κ und λ leichten Ketten-Gensequenzen findet in der Fraktion D statt. Der B-Zellrezeptor (engl.: B

cell receptor, BCR) entsteht durch den Zusammenschluss von je zwei schweren und zwei leichten Ketten auf der Oberfläche unreifer B-Zellen (Fraktion E). Es erfolgt eine Selektion der B-Zellen mit funktionellem BCR. B-Zellen mit einem selbstreaktiven oder funktionslosen BCR werden eliminiert. Nach diesem Selektionsprozess migrieren unreife B-Zellen in Form eines Übergangsstadiums (T1 und T2; engl.: *transitional*) in die Milz und differenzieren zu reifen follikulären (FOL) oder Marginalzonen (MZ)-B-Zellen aus (Allman und Pillai, 2008). FOL B-Zellen repräsentieren die Mehrheit der B-Lymphozyten. Sie zirkulieren zwischen den Follikeln der sekundären lymphatischen Organe, dem Blut und dem Knochenmark. Im Knochenmark werden diese rezirkulierenden Zellen als definierte Fraktion F identifiziert (Hardy und Hayakawa, 1995). FOL B-Zellen sind essentiell für die T-Zell-abhängige humorale Immunantwort. Die humorale Immunantwort beinhaltet die Produktion von Antikörpern. Für diesen Prozess sind die von reifen peripheren B-Zellen abgeleiteten Plasmazellen verantwortlich, die T-Zell-abhängig oder auch T-Zell-unabhängig über die Antigenbindung des BCR generiert wurden. Die Proliferation und Differenzierung aktivierter B-Zellen in sekundären lymphatischen Geweben wird als Keimzentrums (GC; engl.: *germinal center*)-Reaktion bezeichnet. Es entsteht eine Population von B-Zellklonen, deren BCR durch somatische Hypermutation weiter diversifiziert und für die Erkennung eines spezifischen Antigens optimiert wurde (McHeyzer-Williams et al., 2001).

Im Stroma von Milz und Lymphknoten verschiedener Mausstämme, wie C57BL/6 und BALB/c, wurde die Expression von Hh-Proteinen nachgewiesen (Dierks et al., 2007). Insbesondere wird Shh von follikulären dendritischen Zellen produziert. Die Arbeit von Sacedon *et al.* spricht dafür, dass in Anwesenheit eines Hh-Signals B-Zellen im Keimzentrum vor Apoptose geschützt sind (Sacedon et al., 2005). Weiterhin kann eine Stroma-induzierte Hh-Signalgebung das Überleben von malignen B-Zellen *in vitro* unterstützen. Für diese Untersuchungen wurden Zellen von E μ -Myc Tieren verwendet, die Myc in der B-Zelllinie unter der Kontrolle des Igh (engl.: *immunoglobulin heavy chain*; Immunoglobulin schwere Kette)-Enhancers (Verstärker) überexprimieren und in infolgedessen ein malignes B-Zelllymphom entwickeln. Die Inhibition des Hh-Signalweges in Lymphomzellen bewirkte *in vitro* die Induktion von Apoptose. Die Inhibition wurde pharmakologisch mit dem Alkaloid Cyclopamin durchgeführt, das spezifisch an den Smo-Rezeptor bindet und somit seine inaktivierte Konformation stabilisiert. Zusätzlich konnte

gezeigt werden, dass die Expansion muriner Lymphomzellen in erkrankten Tieren mittels der genannten Hh-Inhibition inhibiert werden kann (Dierks et al., 2007).

Die Rolle des Hh-Signalweges in der Myelopoese

Andere Studien befassten sich mit der Einflussnahme des Hh-Weges auf die frühen hämatopoetischen Progenitoren und Stammzellen. In einem humanen experimentellen *in-vitro*-System wurde die Fähigkeit zur Koloniebildung der Progenitoren unter der Zugabe des Smo-Inhibitors Cyclopamin untersucht (Taipale et al., 2000). Die Fähigkeit zur Koloniebildung in einem optimierten Medium ist ein funktioneller Nachweis der Proliferations- und Differenzierungseigenschaften von Progenitoren. Während die granulo-monozytären Koloniezahlen unter den oben angeführten Versuchsbedingungen unverändert blieben, war die Inhibition des Smo-Rezeptors mit der Abnahme von erythrozytären Kolonien assoziiert. In den erythrozytären Kolonien, die sich unter der Behandlung mit Cyclopamin ausbildeten, konnte eine verzögerte Hämoglobinsynthese festgestellt werden. Weiterhin wurde eine erhöhte Anzahl granulo-monozytärer Kolonien bei Zugabe des Shh-Liganden und GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) beobachtet, die mit einer anschließenden Cyclopamin-Behandlung wieder auf das Kontrollniveau zurückgeführt werden konnte (Detmer et al., 2000; Detmer et al., 2005). Zusammenfassend sprechen diese Arbeiten dafür, dass der Hh-Signalweg die Myelopoese und insbesondere die Erythropoese beeinflusst.

Während der Erythropoese entstehen Erythropoetin-vermittelt Proerythroblasten aus MEP. Aus diesen Zellen entwickeln sich Erythroblasten, die mit zunehmendem Hämoglobingehalt und Differenzierungsgrad, abnehmenden RNA-Gehalt, sowie abnehmender Proteinsynthese zu Retikulozyten ausreifen. Diese verlassen das Knochenmark und stoßen den Zellkern ab (Socolovsky et al., 2001). Es liegen Daten vor, die für eine Rolle des Hh-Signalweges in der murinen Stresserythropoese der Milz sprechen (Perry et al., 2009). Bestimmte erythrozytäre Vorläufer in der Milz der Mäuse expandieren und differenzieren im Falle einer akuten Anämie. Diese spezielle Population muss erhalten werden. Hierfür wandern Zellen aus dem Knochenmark in die Milz und entwickeln sich dort, abhängig vom Hh-Signal, zu sogenannten *BMP4-responsive* (dt.:

reaktionsfähigen; BMP4^R) Stressprogenitoren. Perry *et al.* zeigte, dass die Transplantation von murinen Smo-defizienten Knochenmarkzellen in eine c-kit-defiziente Maus, die nicht in der Lage ist BMP4^R-Stressprogenitoren zu entwickeln, im Gegensatz zu transplantiertem Wildtyp-Knochenmark, zu keiner Differenzierung von spezialisierten BMP4^R-Vorläufer in der Milz der c-kit-*knockout*-Tiere führte. Isolierte Ptch^{Null}-Knochenmarkzellen wiesen hingegen in einem CFU-Assay eine erhöhte Ausbildung von Stress-erythrozytären Kolonien auf.

Die Rolle des Hh-Signalweges in malignen Erkrankungen

Eine zentrale Rolle des Hh-Signalweges wurde in einer Reihe von malignen Erkrankungen beschrieben. Überexprimierte oder mutierte Komponenten wurden z. B. mit der Entstehung des Medulloblastoms oder Basalzellenkarzinoms, sowie mit der Entstehung von Prostata-, Magen-, Lungen-, Darm- und Pankreaskarzinomen in Verbindung gebracht (Berman *et al.*, 2002; Berman *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996; Karhadkar *et al.*, 2004; Thayer *et al.*, 2003; Watkins *et al.*, 2003). Zudem scheint der Hh-Signalweg in die Selbsterneuerung leukämischer Stammzellen bestimmter Leukämieformen involviert zu sein (Huntly und Gilliland, 2005). Es konnte insbesondere nachgewiesen werden, dass dem Hedgehog-Signalweg eine essentielle Funktion für den Erhalt leukämischer Stammzellen bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zukommt (Zhao *et al.*, 2009; Dierks *et al.*, 2008). Der Einfluss des Hh-Signalweges wurde mit der Initiation der Leukämie durch die Philadelphia-Translokation t(9;22) und dem daraus resultierenden Bcr-Abl-Protein in einem Maustransplantationsmodell untersucht. Die genetische Ausschaltung von Smo in der regulären Hämatopoese zeigte keinen Einfluss, jedoch in der Bcr-Abl-positiven Hämatopoese wurde die Entwicklung der Leukämie in den erkrankten Mäusen inhibiert und eine Transplantation der Leukämie in sekundäre Tiere war nicht möglich. Dies weist auf den Verlust leukämischer Stammzellen in Smo-defizienten Tieren hin. Die Behandlung humaner CML-Zellen *in vitro* ließ ebenfalls auf die Beteiligung des Hh-Signalweges an dem Erhalt der leukämischen Stammzellpopulation schließen (Dierks *et al.*, 2008).

In Zusammenfassung ist die Funktion des Hh-Signalweges in der Hämatopoese und in Hh-assoziierten malignen Erkrankungen bis heute erst in Ansätzen

verstanden. *In-vitro*-Untersuchungen und Versuche mit ubiquitären Hh-Signalweg-*knockout*-Mausmodellen sprechen für eine funktionelle Bedeutung des Hh-Signalweges in der Hämatopoese. Diese Beobachtungen widersprechen neusten Untersuchungen an Hämatopoese-spezifischen *Smo-knockout*-Modellen, die in dieser Arbeit beschrieben werden und auch von anderen Gruppen im Jahr 2009 veröffentlicht wurden (Gao et al., 2009; Hofmann et al., 2009). Gesichert erscheint die funktionelle Rolle des Hh-Signalweges für den Erhalt einiger maligner hämatologischer Erkrankungen, wie der Bcr-Abl-positiven CML und einigen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen.

1.4 Das transgene Mausmodell

Da ein mehrzelliger Organismus ein komplexes System aus sich gegenseitig beeinflussenden regulativen Mechanismen darstellt, wurde nach geeigneten Modellen zur Erforschung genetischer Mechanismen *in vivo* gesucht. Die Wahl eines Tiermodells ist naheliegend, da es ermöglicht, Wechselwirkungen zu beobachten, die in einem *in-vitro*-System aufgrund der fehlenden molekularen und zellulären Umgebung nicht vorhanden sind.

Im Mausmodell ist es durch die sogenannte transgene Methodik technisch möglich, Erbinformation zu modifizieren. Man unterscheidet zwei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze zur Herstellung transgener Mäuse.

Bei dem älteren Ansatz, der vornehmlich der Überexpression von Genen dient, wird durch Mikroinjektion ein DNA-Konstrukt in eine befruchtete Eizelle eingebracht. Innerhalb des neueren Ansatzes wird eine gesteuerte Modifikation (homologe Rekombination) des Erbguts durch Einbringung eines DNA-Konstruktes angestrebt. Innerhalb dieses neueren Ansatzes wird die modifizierte DNA zunächst in embryonale Stammzellen eingebracht.

Bei dem älteren, klassischen Ansatz werden transgene Mäuse durch die Injektion eines genetischen Vektors in den Pronukleus einer fertilisierten Oozyte generiert (Gordon et al., 1980). Diese Methode wird Vorkernmikroinjektion genannt. Die einzellige injizierte Zygote wird im Anschluss in ein pseudo-gravidies Empfängerweibchen transferiert. Das transgene Konstrukt für diesen Ansatz besteht meistens aus einem spezifischen Enhancer (dt.: Verstärker) und einem Promotor, der die Genexpression in einem bestimmten Gewebe oder während

eines bestimmten Entwicklungsstadiums steuert. Weiterhin beinhaltet das Konstrukt die cDNA (engl.: *complementary*)-Gensequenz des zu exprimierenden Gens und ein Polyadenylierungssignal. Die Insertion des in den Pronukleus injizierten DNA-Konstruktes verläuft zufällig. Dadurch können unerwünschte Nebeneffekte entstehen. Die Position des Konstruktes kann im Einzelfall dazu führen, dass die Funktion des durch die DNA-Integration betroffenen endogenen Genlokus eingeschränkt (Wilson et al., 1990) oder auch die Expression des inserierten Transgens durch benachbarte Elemente beeinträchtigt wird (Rijkers et al., 1994).

Der neuere Ansatz zur Herstellung transgener Mäuse wurde durch die Entdeckung der homologen DNA-Rekombination in embryonalen Stammzellen ermöglicht (Wong und Capecchi, 1986). Mit Hilfe dieser Methodik wurden die ersten *knockout*-Mäuse generiert. Das eingebrachte transgene Konstrukt beinhaltet homologe Teilbereiche zu der endogenen Zielsequenz, was in der gerichteten Insertion des Transgens resultiert. Durch homologe Rekombination können somit gezielt ganze Teilbereiche eines Ziellokus verändert oder ersetzt werden. Die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ist ein relativ seltenes Ereignis. Deshalb werden für den Nachweis der erfolgreichen Integration des Konstrukts unterschiedliche Strategien verwendet. Durch den Einsatz einer Neomycin-Resistenz-Kassette (kurz: NEO^R) können die embryonalen Stammzellen (ES) selektiert werden, die das Konstrukt in ihr Genom aufgenommen haben. Diese rekombinierten ES-Zellen werden in eine Mausblastozyste injiziert, die anschließend in ein pseudo-gravidas Weibchen transferiert wird. Die Nachkommen sind chimäre Mäuse, da die transferierten ES-Zellen sich an der Entstehung der Gewebe beteiligen. Nach erfolgter Transmission des Transgens in die Keimbahn können in der zweiten Filialgeneration heterozygote transgene Tiere identifiziert werden (Bockamp et al., 2002).

Abhängig von der Funktion des ausgeschalteten Gens können ubiquitäre *knockout*-Mäuse embryonal oder auch *post natal* letal sein. Um eine frühe Letalität zu umgehen, sind Gewebe-spezifische und zeitlich kontrollierte Gendeletionsverfahren *in vivo* entwickelt worden. Das für die vorliegende Arbeit relevante System beinhaltet die Verwendung der Cre-Rekombinase (Cre; engl.: *causes recombination*) in Kombination mit loxP (engl.: *locus of X-ing over*)-Zielsequenzen des Bakteriophagen P1. Die Cre-Rekombinase erkennt und schneidet

gentechnisch loxP-flankierte DNA-Sequenzen aus dem Genom und lässt die herausgetrennte DNA als Ring zurück, der dann abgebaut wird. Die loxP-Sequenz (34 bp; Basenpaare) enthält eine asymmetrische Kernregion, die von zwei *inverted repeats* (dt.: Palindromen) flankiert wird. In dieser Kernregion findet die Rekombination statt. Zwei separate loxP-sites werden zur Deletion der dazwischen liegenden Sequenz genutzt. Ist die deletierte Sequenz essentiell für die Funktion eines Gens (z. B. ein kodierendes Exon), wird dieses Gen funktionell vollständig ausgeschaltet (Abb.1.3). Wenn die deletierte Sequenz zuvor eine Genexpression blockiert hat, wie z. B. durch eine loxP-flankierte STOP-Kassette, kann durch die Deletion dieser Kassette die Expression eines Transgens aktiviert werden. Die Generierung von Tieren mit spezifisch loxP-flankierten konditionalen Allelen erfolgt durch homologe Rekombination.

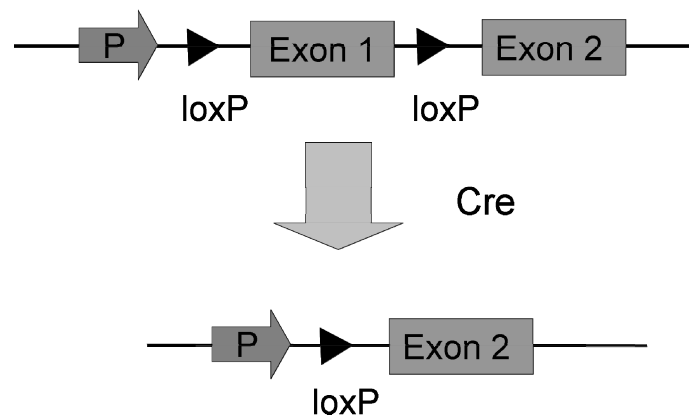


Abb.1.3: Das Cre/loxP-System. Die Cre-Rekombinase rekombiniert spezifisch loxP-flankierte DNA-Sequenzen. Ein Beispiel der Rekombinase-vermittelten Geninaktivierung ist dargestellt. P, Lokus-spezifischer Promotor; Cre, Cre-Rekombinase; loxP, Sequenz, die von der Cre erkannt und rekombiniert wird; pA, pA-Sequenz.

Die zeitliche Kontrollierbarkeit des Systems kann durch die induzierbare Cre-ER^T (engl.: *estrogen receptor tamoxifen-inducible*)-Rekombinase erreicht werden (Feil et al., 1996; Metzger et al., 1995). In den Zielzellen des Transgens wird hierbei ein Fusionsprotein zwischen Cre-Rekombinase und einer mutierten Ligandenbindenden Domäne des humanen Östrogenrezeptors exprimiert. Das chimere Cre-ER^T-Protein kann durch die Applikation von Tamoxifen aktiviert werden. In der Abwesenheit von Tamoxifen wird das Fusionsprotein Cre-ER^T durch die Bindung des Steroidhormonrezeptor-Kofaktoren an Hsp90 (engl.: *heat shock protein*) im

Zytoplasma der Zelle gehalten. Erst durch die Administration von Tamoxifen werden die nukleäre Translokation des Cre-ER^T-Proteins und damit die DNA-Rekombination erreicht.

Ist eine zeitliche Regulation nicht von Bedeutung, kann ein konstitutiv aktiviertes Cre-Transgen verwendet werden. Ein Beispiel für eine transgene Maus mit einer konstitutiven Cre-Rekombinase ist die Vav-iCre-Maus. Bei dieser Maus findet die Cre-Expression in frühen hämatopoetischen Zellen statt und erfordert keine weitere Induktion. Die Zelltyp-spezifische Expression der Cre-Rekombinase und somit die Aktivierung oder Deletion eines loxP-flankierten Zielgens wird durch die Wahl des Cre-kontrollierenden Promotors bestimmt (Smith et al., 1995).

Zusammenfassend sind zwei transgene Sequenzen in einem Organismus notwendig, um ein Cre/loxP-System zu nutzen. Die Sequenz der Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines zell- oder gewebespezifischen Promotors und die loxP-modifizierte Sequenz des zu modifizierenden Gens. Schneidet die Cre-Rekombinase die flankierten DNA-Abschnitte heraus, kann die Expression dieses Gens, abhängig vom genetischen Modell, verhindert oder aktiviert werden.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Doktorarbeit hatte zum Ziel, den Einfluss des Hh-Signalweges auf die Funktion und Differenzierung

- hämatopoetischer Stammzellen,
- hämatopoetischen Progenitoren,
- früher und reifer B-Zellen,
- früher und reifer T-Zellen,
- und von Thymusepithelzellen

in vivo zu untersuchen.

Mit Hilfe der konditionalen Deletion von Smoothed sowie der konstitutiven Aktivierung dieses Rezeptors war geplant, den Effekt des veränderten Hh-Signalweges auf die oben aufgelisteten Zellsysteme zu untersuchen.

- Ziel der Untersuchungen war zunächst, die erfolgreiche genetische Manipulation innerhalb der zu untersuchenden Zellsysteme nachzuweisen.
- Die funktionellen Konsequenzen der genetischen Smo-Rekombination sollten vornehmlich mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden.
- Des Weiteren sollten die Expression der Zielgene der Hh-Signalkaskade, sowohl als auch die Expression der Hauptkomponenten des Hh-Signalweges mit Hilfe von PCR untersucht werden.
- Um die Progenitoreigenschaften zu analysieren sollten funktionelle Tests (Fähigkeit zur Koloniebildung) verwendet werden.
- Da die hämatopoetischen Zellkompartimente und deren Entwicklung im Fokus dieser Arbeit standen, sollten die zelluläre Zusammensetzung des peripheren Blutes analysiert werden.
- Bei dem Auftreten maligner Tumore sollten diese mit Hilfe von gefärbten Gewebeschnitten klassifiziert werden.

2. Material/Methoden

2.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

2.1.1 chemische Substanzen

Agarose (Ultra Pure™)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Aqua dest.	Braun, Ecotainer®, Melsungen, D
DMSO	Sigma®, St. Louis, USA
dNTPs	Promega, Madison, USA
D-PBS	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA	Sigma®, St. Louis, USA
Eisessig	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze, D
Ethidiumbromid	Invitrogen, Carlsbad, USA
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, San Jose, USA
FCS	PAA Laboratories, Pasching, A
Formaldehydlösung	Fischar, Saarbrücken, D
Gel Loading Solution 6x	Sigma®, St. Louis, USA
Größenstandard	New England Biolabs, Ipswich, USA
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isofluran	Abbott, Abbot Park, USA
Isopropanol	Sigma®, St. Louis, USA
Maiskeimöl	Sigma®, St. Louis, USA
Mercaptoethanol	BioRad, München, D

MgCl	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumazid	Sigma [®] , St. Louis, USA
NaCl	CabioChem [®] , Darmstadt, D
NaOH	Sigma [®] , St. Louis, USA
O.C.T. compound TissueTek [®]	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
PCR-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, A
Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteinase K	Sigma [®] , St. Louis, USA
SDS	Sigma [®] , St. Louis, USA
Tamoxifen	Sigma [®] , St. Louis, USA
Tris (Ultra Pure [™])	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypanblau	Sigma [®] , St. Louis, USA

2.1.2 Materialien

EDTA-Monovetten [®]	Sarstedt, Nümbrecht, D
FACS- <i>tubes</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
Filter (40 und 100 µm)	BD Biosciences, San Jose, USA
Flachbodenplatte (6er)	BD Biosciences, San Jose, USA
Injektionsnadeln	BD Biosciences, San Jose, USA
Kapillarpipette	Hirschmann [®] Laborgeräte, Eberstadt, D
Neubauerzählkammer	Assistent, Sondheim, D
Petrischalen	BD Biosciences, San Jose, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, D
Pipettoren (elektronisch)	Hirschmann [®] Laborgeräte, Eberstadt, D
Rundbodenplatte (96er)	BD Biosciences, San Jose, USA
Zellkulturpipetten	BD Biosciences, San Jose, USA

2.1.3 Geräte

Autoklav	Systec D-65, Wetttemberg, D
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, San Jose, USA
BD™LSR II	BD Biosciences, San Jose, USA
Binokular	Olympus, Hamburg, D
BioDocAnalyze-System	Biometra GmbH, Göttingen, D
BRL Stromversorger	Gibco®, Carlsbad, USA
Gelelektrophoresekammer	Sub-Cell® GT, BioRad, München, D
Inkubator	Forma Scientific
Mikroskope	
	Lichtmikroskop, Zeiss, Jena, D
	Leitz Diavert, Stuttgart, D
Photometer plus	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilbänke	
	NU Aire, Plymouth, USA
	Lamina Flow, BSH AG, Dettingen, D
Thermocycler	Analytik Jena, Jena, D
Thermomixer	Comfort, Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	5417C, Eppendorf, Hamburg, D
Waagen	
	EW 4200-2NM, Kern, Balingen, D
	ALJ 220-4NM, Kern, Balingen, D
Zentrifuge Allegra™ 6KR	Beckman Coulter, Fullerton, USA

2.1.4 Lösungen und Puffer

EDTA-Lösung:	186,12 g	Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O
	10 g	NaOH
	ad. 1 l Aqua dest.	
Puffer für die Durchflusszytometrie	1l	PBS
	0,5 %	Natriumazid

TAE-Puffer (50x):	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M (pH 8,0) EDTA
	<i>ad.</i> 1 l Aqua dest.	
	Gebrauchslösung 1x	
Lyse-Puffer	0,2 M	NaCl
	5 mM	EDTA (pH 8,5)
	0,1 M	Tris-HCl Puffer
	<i>ad.</i> Aqua dest.	
Tris-HCl-Puffer (1 M):	121,14 g	Tris
	<i>ad.</i> 1 l Aqua dest.	
	pH 8,5 einstellen	

2.1.5 Kits

Qiagen QIAamp® DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden, D
Qiagen QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
Qiagen RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, D
Advantage® RT-for-PCR Kit	ClonTech, Mountain View, USA
BD OptEIA™ mouse IgG2a ELISA Set	BD Biosciences, San Jose, USA

2.1.6 Medien

MethoCult®3434	StemCell Technologies, Vancouver, CDN
MethoCult®3334	StemCell Technologies, Vancouver, CDN
RPMI-Medium 1640	Gibco®, Carlsbad, CA, USA

2.2 Mäuse

Die gentechnischen Grundlagen dieser Arbeit sind die konditionale Gendeletion des Smoothened-Rezeptors und die daraus resultierende Deaktivierung des Hh-Signalweges sowie die konstitutive Überexpression abhängiger Hh-Zielgene aufgrund der eingebrachten Smoothened-Rezeptor-Mutation 2 (SmoM2) in den unterschiedlichen Zellkompartimenten *in vivo*. Die konditionale Genmanipulation erfolgte mit Hilfe des Cre/loxP-Systems.

Um ein zell- bzw. gewebespezifisches *knockout* des Smoothened (Smo)-Rezeptors zu erreichen, wurden unterschiedliche Hämatopoese-spezifische Cre-transgene Mäuse mit konditionalen Smo-*knockout* (Smo^{loxP/loxP})- (Long et al., 2001) und konstitutiven Smo-*knockout* (Smo^{Null/wt})-Mäusen (Zhang et al., 2001) verkreuzt. In einem komplementären Modell wurde eine konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges durch die Verkreuzung von Hämatopoese-spezifischen Cre-transgenen Mäusen mit konditionalen R26^{SmoM2}- Mäusen (Jeong et al., 2004) erreicht. Die genetisch modifizierten Smo-Mausstämme wurden von *The Jackson Laboratory* käuflich erworben.

Smo^{Null/wt} (129X1-Smoh^{tm1Amc})-Mäuse (Jackson Laboratory Stock #: 004288)

In den Smo^{Null/wt}-Tieren wurde mittels homologer Rekombination der hintere Teil des Smo-Exon 1 durch eine NEO^R-Kassette ersetzt. Durch diesen Teilverlust von Exon 1 entsteht ein Null (*knockout*)-Allel, da das ATG-Startcodon und die kodierende Sequenz des N-Terminus von Smoothened durch die eingebrachte NEO^R-Kassette ersetzt wurden (Abb.2.1).

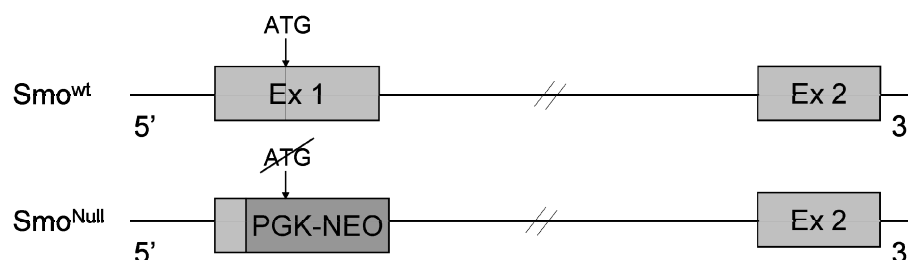


Abb.2.1: Schematische Darstellung des Smo^{Null}-Allels im Vergleich zum Smo^{wt}-Allel. Im Smo^{Null}-Allel wurde die Sequenz des Smo-Exon 1 44 bp *upstream* (dt.: stromaufwärts gerichtet) bis

358 bp *downstream* (dt.: stromabwärts gerichtet) des Startcodons (ATG) durch eine NEO^R-Kassette ersetzt. PGK, engl.: *phosphoglycerine kinase promoter*; NEO, NEO^R-Kassette; Ex, Exon.

Smo^{loxP} (*Smo*^{tm2Amc})-Mäuse (Jackson Laboratory Stock #: 004526)

Für die Herstellung eines konditionalen *Smo*-Allels wurden ebenfalls mit Hilfe von homologer Rekombination Sequenzen des *Smo*-Exon 1 und eine integrierte NEO^R-Kassette durch loxP-Sequenzen flankiert. Die Flankierung durch loxP-sites betrifft den gleichen genomischen Abschnitt, der im *Smo*^{Null}-Allel durch die NEO^R-Kassette ersetzt wurde. In bisherigen Untersuchungen konnte durch die Einbringung der loxP-sites und der NEO^R-Kassette keine Beeinträchtigung der Funktionalität des *Smo*^{loxP}-Allels im Vergleich zum *Smo*^{wt}-Allel nachgewiesen werden (Long et al., 2001). Bei Anwesenheit der Cre-Rekombinase im Nukleus wird das *Smo*^{loxP}-Allel rekombiniert und es entsteht ein funktionelles Null-Allel (Abb.2.2). Die in dem *Smo*^{loxP}-Allel enthaltene Tau-LacZ-Sequenz hat für die vorliegende Arbeit keine Bedeutung.

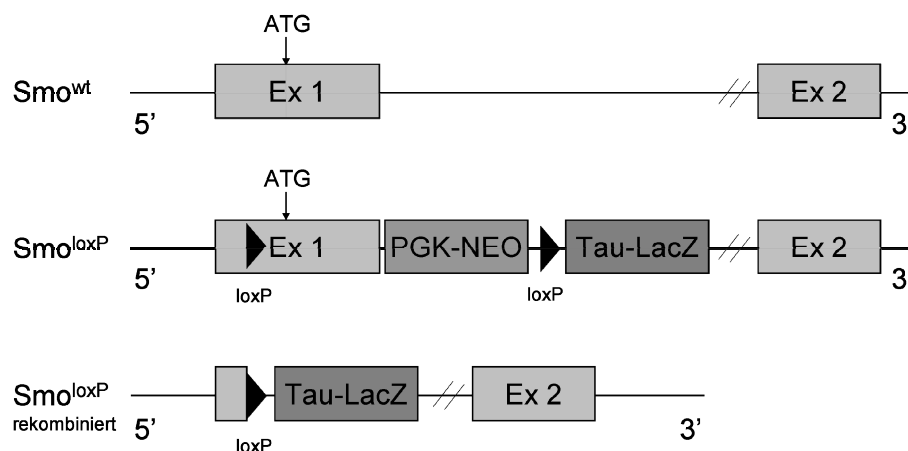


Abb.2.2: Schematische Darstellung des *Smo*^{loxP}-Allels und des rekombinierten *Smo*^{loxP}-Allels im Vergleich zum *Smo*^{wt}-Allel. Die eingekreuzte Cre-Rekombinase schneidet spezifisch die loxP-Zielsequenzen und deletiert somit die Teilsequenz des *Smo*-Exon 1 44 bp *upstream* und 358 bp *downstream* des Startcodons (ATG). PGK, engl.: *phosphoglycerine kinase*; NEO, NEO^R-Kassette; Ex, Exon; Tau, Taurin; LacZ, β -Galaktosidase.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Verkreuzung von *Smo*^{Null/wt}- mit *Smo*^{loxP/loxP}-Tieren und der zusätzlichen Verkreuzung mit Cre-transgenen Tieren gewebe- bzw. zellspezifische *Smo*-knockout-Modelle generiert (Cre; *Smo*^{loxP/Null}).

R26^{SmoM2} (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(Smo/YFP)Amc})-Mäuse
(Jackson Laboratory Stock #: 005130)

Die kontinuierliche Hh-Ligand-unabhängige Aktivierung des Hh-Signalweges wurde durch die Expression einer konstitutiv aktiven Form des Smoothened-Proteins (SmoM2) bewirkt. Das SmoM2-Protein ist eine Mutante des Smoothened-Rezeptors, die aus Proben des humanen Basalioms kloniert wurde (Xie et al., 1998). Die hier verwendete murine Variante des SmoM2-Proteins enthält an der Position 539 des murinen Smoothened anstatt eines Tryptophans ein Leucin (Taipale et al., 2000). SmoM2 ist somit der Inhibition durch das Membranprotein Ptch entzogen, was eine dauerhafte Aktivierung des Signalweges zur Folge hat. Mit Hilfe des SmoM2-Gens wurde ein Mausmodell generiert, das eine Cre-abhängige Aktivierung des Hh-Signalweges erlaubt. Für die Herstellung dieser sogenannten R26^{SmoM2}-Tiere wurde in den ubiquitär aktiven Rosa26 (R26)-Lokus durch homologe Rekombination die cDNA-Sequenz der SmoM2-Mutante eingebracht. Zusätzlich befindet sich auf dem R26^{SmoM2}-Allel, 3' zur Sequenz des SmoM2-Gens, die Gensequenz für das gelb fluoreszierende Protein YFP (engl.: *yellow fluorescent protein*).

Um die Cre-Abhängigkeit der SmoM2-YFP-Expression als Fusionsgen zu ermöglichen, wurde 5' der cDNA des SmoM2-YFP-Gens eine loxP-flankierte STOP-Kassette einkloniert. In der Anwesenheit einer Cre-Rekombinase wird die STOP-Kassette entfernt und die Expression von SmoM2 induziert. Die STOP-Kassette besteht aus einer NEO^R-Kassette gefolgt von drei aufeinander folgenden Polyadenylierungssignalen (PGK/NEO/pA-Sequenz) und wird in den folgenden Abbildungen und Ausführungen weiterhin als STOP-Kassette bezeichnet. Diese STOP-Kassette verhindert die Transkription der cDNA-Sequenz des SmoM2-YFP-Komplexes. Wenn jedoch eine Cre-induzierte Deletion der STOP-Kassette stattfindet, erfolgt die R26-Promotor-vermittelte Transkription des SmoM2-YFP-Fusionsproteins (Abb.2.3).

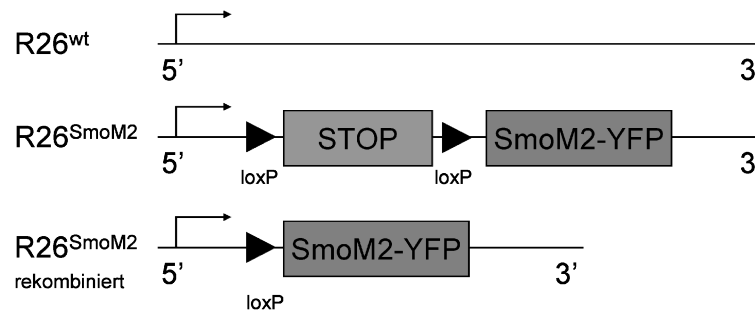


Abb.2.3: Schematische Darstellung des R26^{SmoM2}-Allels und des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels im Vergleich zum R26^{wt}-Allel. Die eingekreuzte Cre-Rekombinase schneidet spezifisch die loxP-Zielsequenzen und deletiert somit die STOP-Kassette, was in der Aktivierung der SmoM2-YFP-Expression resultiert.

R26^{EYFP} (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos})-Mäuse
(Jackson Laboratory Stock #: 006148)

Die Fluoreszenzintensität des SmoM2-YFP-Proteins ist unter Verwendung durchflusszytometrischer Analysen nach eigenen Beobachtungen niedriger als die Intensität des verstärkten EYFP (engl.: *enhanced yellow fluorescent protein*), das ebenfalls über den R26-Lokus exprimiert wurde (R26^{EYFP}). Um die Analyse Cre-rekombinierter Zellen im Durchflusszytometer präziser durchführen zu können, wurde in einigen Tieren zusätzlich zum bereits erwähnten R26^{SmoM2}-Allel das R26^{EYFP}-Allel eingekreuzt (Abb.2.4).

Die Cre-vermittelte Rekombination des R26^{EYFP}-Allels erfolgt analog zur Rekombination des beschriebenen R26^{SmoM2}-Allels. Im Anschluss findet die Expression des EYFP statt.

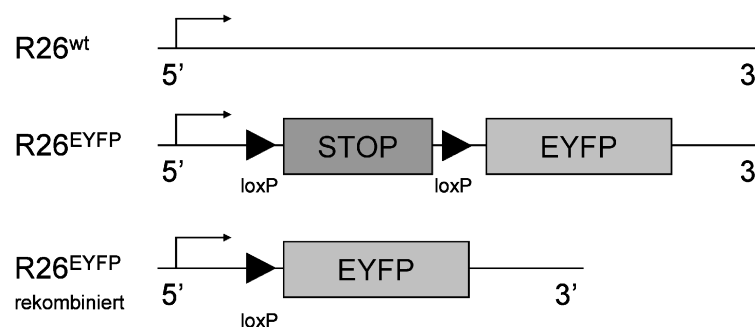


Abb.2.4: Schematische Darstellung des R26^{EYFP}-Allels und des Cre-rekombinierten R26^{EYFP}-Allels im Vergleich zum R26^{wt}-Allel. Die eingekreuzte Cre-Rekombinase schneidet spezifisch die

loxP-Zielsequenzen und deletiert somit die STOP-Kassette, was in der Aktivierung der EYFP-Expression resultiert.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Cre-Systeme ist der Einfluss des Hh-Signalweges auf die Hämatopoese von der hämatopoetischen Stammzelle über die hämatopoetischen Progenitoren bis zur reifen hämatopoetischen Zelle und ihrer unmittelbaren Umgebung untersucht worden.

Es wurde das Vav-iCre-Transgen zur Rekombination in der kompletten Hämatopoese verwendet. Zusätzlich wurde das durch TAM-Applikation zeitlich kontrollierbare HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgen, das vornehmlich in HSC aktiv ist, benutzt. Für die Genmanipulation spezifisch in der B-Zellentwicklung wurde die CD19-Cre-*knockin*-Maus verwendet (Abb.2.5).

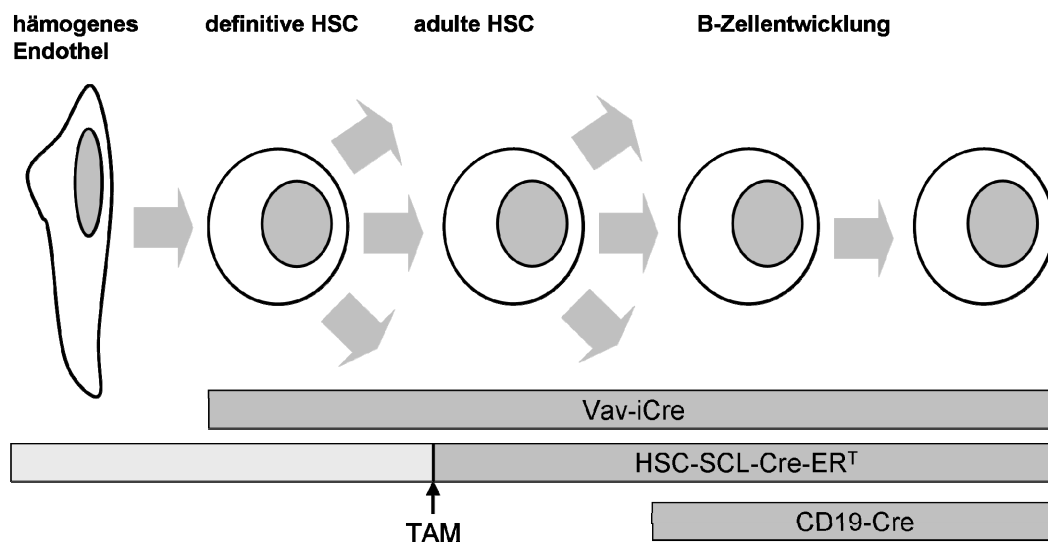


Abb.2.5: Schematische Darstellung der Aktivität Hämatopoese-spezifischer Cre-Rekombinasen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien, definitiver HSC und exemplarischer Ausdifferenzierung in B-Zellen. Die Vav-iCre-Rekombinase, HSC-SCL-Cre-ER^T-Rekombinase (kurz: SCL-Cre-ER^T) und CD19-Cre-Rekombinase stellen innerhalb dieser Arbeit verwendete Cre-Rekombinasen dar. Die Cre-Expression setzt zu unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe Balken) während der Entwicklung (graue Pfeile) des hämatopoetischen Systems ein. Die Aktivierung der SCL-Cre-ER^T-Rekombinase wird durch die Gabe von Tamoxifen (TAM) nach der embryonalen Hämatopoese induziert (schwarzer Pfeil).

HSC-SCL-Cre-ER^T-Mäuse

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Induktion der Deletion des Smo-Rezeptors und auch für die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges durch das SmoM2-Protein das Tamoxifen-induzierbare HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgen [kurz: SCL-Cre-ER^T; (Gothert et al., 2005)] verwendet (Abb.2.5 und 2.6).

Das SCL-Cre-ER^T-System erlaubt eine zellspezifische, zeitlich kontrollierbare genetische Manipulation von HSC.

Die räumlich begrenzte Manipulation des Hh-Signalweges wird durch die SCL-Cre-Rekombinase, hier unter der Kontrolle des Stammzell-*Enhancers* (dt.: Verstärker; auch 3'-Enhancer genannt) des SCL (engl.: *stem cell leukaemia*)–Lokus, vermittelt. Der SCL 3'-Enhancer ist verantwortlich für die SCL-Expression spezifisch in frühen hämatopoetischen Progenitoren, so dass die Begrenzung dieses genetischen Systems vornehmlich auf das Zellkompartiment der HSC gegeben ist.

Das SCL-6E5/Cre-ER^T/3'enh-Konstrukt (Abb.2.6A), das für die Generierung der transgenen HSC-SCL-Cre-ER^T-Maus genutzt wurde, ist mit Hilfe von pronukleärer Injektion in ein fertilisiertes Ovum eingebracht worden. Die cDNA-Sequenz des Cre-ER^T-Plasmids wurde *downstream* (dt.: stromabwärts gerichtet) des 6E5 Promotors und *upstream* (dt.: stromaufwärts gerichtet) des 3'-Enhancers kloniert. Das 6E5 genomische DNA-Fragment beinhaltet den SCL-Exon 4-Promotor kombiniert mit einer 5.5 kb großen SCL 3'-Enhancer-Sequenz, um die Expression der Cre-ER^T-Rekombinase in HSC und Progenitoren zu aktivieren. Die Cre-Rekombination ist durch die Fusion des Cre-Proteins mit einem Östrogenrezeptoranteil zeitlich kontrollierbar. Erst durch die Applikation von Tamoxifen (TAM) findet die Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus statt (Abb.2.6B) und eine Rekombination der loxP-flankierten Zielsequenzen kann erfolgen. Bei der Verwendung des HSC-SCL-Cre-ER^T-Systems ist zu beachten, dass sich durch dieses System genetisch rekombinierte HSC an der Hämatopoese beteiligen. Dementsprechend nimmt über die Zeit der Anteil an rekombinierten reifen hämatopoetischen Zellen kontinuierlich zu (Gothert et al., 2005).

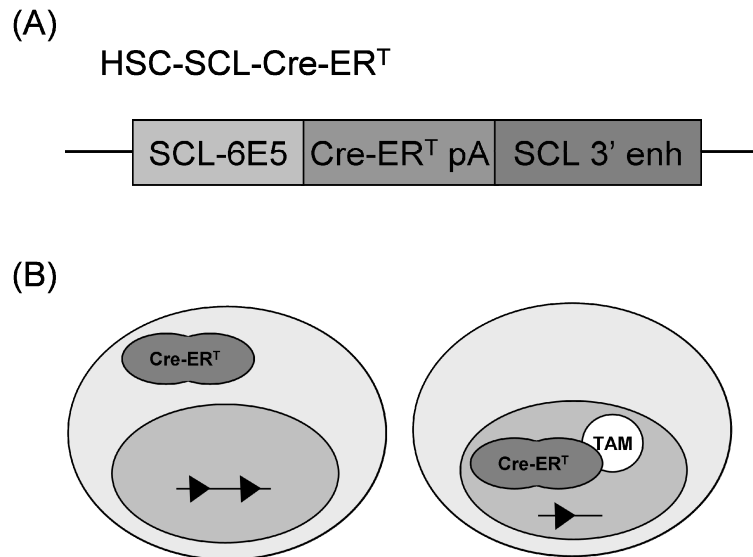


Abb.2.6: Schematische Darstellung des (A) HSC-SCL-Cre-ER^T-Konstruktes und (B) der Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen. Erst nach der Bindung von TAM an das Cre-ER^T-Fusionsprotein findet die Translokation der Cre-Rekombinase in den Nukleus statt und die loxP-Zielsequenzen (schwarze Dreiecke) werden rekombiniert. SCL-6E5, SCL-6E5 Promotor; Cre-ER^T, cDNA-Sequenz der Cre-Rekombinase und des Östrogenrezeptoranteils; SCL 3' enh, SCL 3'-Enhancer; TAM, Tamoxifen; pA, pA-Sequenz.

Vav-iCre (B6.Cg-Tg(Vav1-cre)A2Kio/J)-Mäuse
(Jackson Laboratory Stock #: 008610)

Die Deletion des Smo-Rezeptors oder die Aktivierung der SmoM2-Expression in hämatopoetischen Progenitoren und allen reifen hämatopoetischen Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Vav-iCre-Rekombinase vermittelt (de Boer et al., 2003). Die entsprechenden transgenen Tiere wurden von *The Jackson Laboratory* erworben. Das hier eingebrachte Vav-iCre-Transgen besteht aus dem vav 1-Onkogen (Vav1)-Promotor sowie der Cre-cDNA und einem Polyadenylierungs-signal (Abb.2.7). Die Aktivität des Vav1-Promotors beginnt in den ersten definitiven HSC, die aus dem hämogenen Endothel des Embryos generiert werden (Chen et al., 2009) (Abb.2.5). Zu diesem Zeitpunkt starten die Expression der iCre-Rekombinase und anschließend die Rekombination der loxP-flankierten Zielsequenzen.

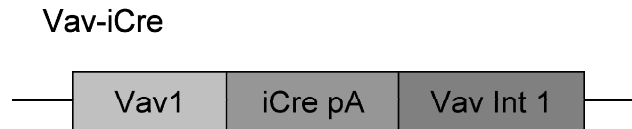


Abb.2.7: Schematische Darstellung des Vav-iCre-Konstruktes. Vav1, vav 1 Onkogen-Promotor; iCre; Sequenz der Cre-Rekombinase; Vav int 1, Vav Intron 1; pA, pA-Sequenz.

Die iCre-Rekombinase (engl.: *improved*; dt.: verbessert) unterscheidet sich von der ursprünglichen Cre-Rekombinase durch die für Eukaryoten angepasste Gensequenz. Die Sequenz der Cre-Rekombinase stammt aus dem Bakteriophagen P1. Das ursprüngliche prokaryotische Cre-Gen enthält 65 CpG-Dinukleotide. Dieser hohe CpG-Gehalt kann in Säugern zu epigenetischen *gene silencing* (dt.: Gen-Stilllegung) führen. Die Sequenz der iCre-Rekombinase wurde für den Einsatz in Säugern optimiert, indem der CpG-Gehalt des Gens reduziert wurde (Shimshek et al., 2002).

CD19-Cre (C.129P2-Cd19^{tm1(cre)Cgn})-Mäuse (Jackson Laboratory Stock #: 004126)

Ein B-Zell-spezifisches exprimiertes Cre-Transgen ist das CD19-Cre-*knockin*-Gen (Abb.2.5 und Abb.2.8). Der CD19-*knockin*-Mausstamm wurde ebenfalls käuflich bei *The Jackson Laboratory* erworben. Die Insertion der Cre-Kassette erfolgte durch homologe Rekombination in das Exon 2 des CD19-Lokus. Da der Locus durch die Insertion der Cre-Kassette inaktiviert wird, ist die Expression des CD19-Korezeptors der heterozygoten Tiere um die Hälfte vermindert. Außer der verminderten CD19-Expression sind bisher keine biologischen Effekte des CD19-Cre-*knockin*-Gens auf die Funktion und Entwicklung der B-Zellen nachgewiesen worden (Rickert et al., 1995).

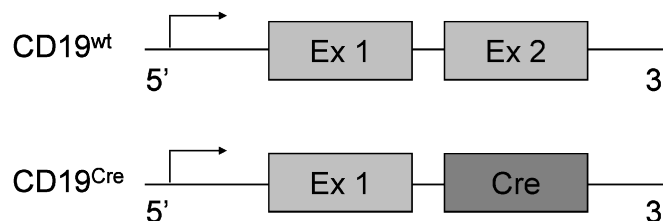


Abb.2.8: Schematische Darstellung des CD19^{Cre}-Allels im Vergleich zum CD19^{wt}-Allel. Ex, Exon; Cre, Sequenz der Cre-Rekombinase.

Foxn1-Cre-Mäuse

Das Foxn1-Cre-Transgen ermöglicht die genetische Manipulation von Thymusepithelzellen (Gordon et al., 2007). In die 3'UTR (untranslatierter Bereich; engl.: *untranslated region*)-Sequenz des Foxn1-Lokus wurde durch homologe Rekombination eine Cre-Kassette inseriert, was zu einer spezifischen Cre-Rekombination der loxP-flankierten Zielsequenzen im embryonalen und adulten Thymusepithel führt.

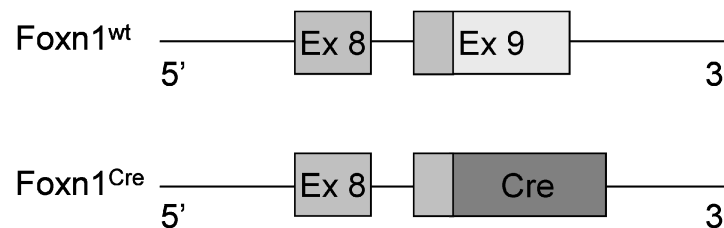


Abb.2.9: Schematische Darstellung des Foxn1^{Cre}-Allels im Vergleich zum Foxn1^{wt}-Allel. Ex; Exon; Cre, Sequenz der Cre-Rekombinase; hellgraue Box des Exon 9 stellt die 3'UTR-Sequenz dar.

Col2-Gal4- und UAS-Ihh-Mäuse

Um den Einfluss des Hh-Signalweges auf die Entwicklung des hämatopoetischen Systems zu untersuchen, wurde ein Gal4/UAS-System verwendet, das spezifisch in Chondrozyten den Transaktivator Gal4 unter der Kontrolle des Col2a1-Promotor/Enhancer exprimiert. Gal4 aktiviert ein zweites Transgen, indem es an die UAS (engl.: *upstream activating sequences*) bindet und somit die Expression eines *downstream* gelegenen Zielgens, hier des Ihh-Liganden des Huhns (clhh; engl.: *chicken*), induziert (Abb.2.10) (Long et al., 2001). Die Expression des clhh erfolgt in diesem System in Chondrozyten, die im sich entwickelnden Knochen in direkter Nachbarschaft zur Hämatopoese in der Knochenmarkhöhle liegen. In den Col2-Gal4;UAS-Ihh-Embryonen ist die Expression des Ihh-Liganden stark erhöht, was zu skelettalen Defekten führt. Dabei kommt es ebenfalls zu Fehlbildungen des Gehirns und der Schädelknochen. Die Tiere versterben bei der Geburt durch respiratorische Dysfunktion.

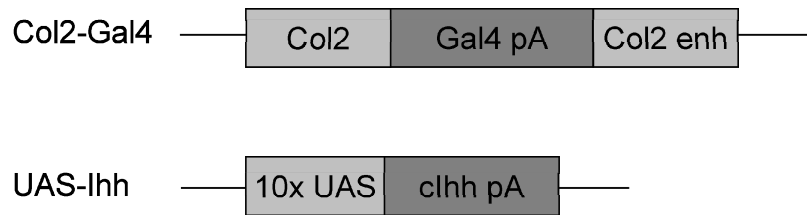


Abb.2.10: Schematische Darstellung des Col2-Gal4- und UAS-Ihh-Konstruktes. Col2, Col2-Promotor; Col2 enh, Col2 Enhancer; pA, pA-Sequenz; clhh, engl.: *chicken indian hedgehog*; UAS, engl.: *upstream activating sequences*.

2.2.1 Haltung, Behandlung, Organentnahme

Die Tierhaltung und Zucht wurde in den Räumen des Zentralen Tierlabors (ZTL) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Im ZTL herrschen standardisierte Versuchsbedingungen durch kontrollierte Umweltbedingungen. Der Lichtwechsel ist den endogenen zirkadianen Rhythmen der Tiere angepasst und betrug 12:12 Stunden. Es wurde eine konventionelle Tierhaltung mittels Filterkäfigen durchgeführt. Es fand täglich ein zugfreier 15-20 facher Luftwechsel statt, bei einer Temperatur von 20 - 24°C und 55 ± 5 % Luftfeuchtigkeit.

Zur Aktivierung des Tamoxifen-induzierbaren HSC-SCL-Cre-ER^T-Systems wurden intraperitoneale (i.p.) Injektionen oder Tamoxifen-angereichertes Spezialfutter (Sniff; Konzentration 0,5-1g/kg) verabreicht. Die Injektion von 2 - 5 mg in Maiskeimöl und 2,5 % Ethanol gelöstem Tamoxifen pro Maus und auch die Gabe des modifizierten Futters führt zu einer Translokation des Cre-ER^T-Fusionsproteins aus dem Zytoplasma in den Nukleus der Zelle.

Die Injektionen wurden jeweils innerhalb von zwei Wochen jeden zweiten Tag durchgeführt. Die Gabe des Spezialfutters wurde über den Gewichtsverlauf der Tiere überwacht. Die Behandlung der Tiere lag bei 2 - 12 Wochen, und die anschließende Analyse erfolgte nach einer Woche bis zu fünf Monaten.

Nach der Untersuchung des Habitus erfolgte die Tötung der genetisch modifizierten Mäuse und der jeweiligen Kontrollen mittels zervikaler Dislokation. Die weitere Morphologie, d.h. die Erscheinung des gesamten Organismus oder der einzelnen Organe, wurde während der Präparation geprüft. Die Organe wurden fixiert (siehe Kap.2.8) und makroskopisch ersichtliche Befunde photographisch festgehalten. Die Organe, wie Milz, Thymus, Lymphknoten und

vor allem das Knochenmark, wurden in RPMI-Medium 1640 mit 20 % fötalen Kälberserum (FCS) aufgenommen.

Das Gewebe von Milz oder Thymus wurde mit Hilfe der angerauten Flächen zweier Objektträger in 2 ml Medium in einer Petrischale zerrieben. Die gewonnenen Zellen wurden mittels einer 1000 µl Pipette in eine Einzelzellsuspension überführt und durch einen 100 µm-Filter pipettiert.

Zur Entnahme des Knochenmarks wurden jeweils beide Oberschenkelknochen (*Femora*) und Schienbeinknochen (*Tibiae*) präpariert. Der Oberschenkelkopf (*Caput femoris*) sowie die Kondylen von *Femur* und *Tibia* wurden mit einer 21 G-Nadel durchstoßen und mit 2 ml Medium gespült. Im Anschluss wurde das Mark resuspendiert und gefiltert.

Für die Präparation von E18,5 Embryonen wurde das Muttertier mittels zervikaler Dislokation getötet. Es wurde der vollständige Uterus entnommen und die Embryonen einzeln aus dem Gewebe des Muttertiers und der Plazenta gelöst. Die Embryonen wurden im Anschluss durch Abtrennung des Kopfes getötet. Die fötale Leber und die Milz der Embryonen wurden in PBS mit 2% FCS aufgenommen und wie die adulte Milz (s.o.) weiterverarbeitet. Für die Entnahme des Knochenmarks wurden *Femora* und *Tibiae* der Tiere in 2 ml der PBS-Lösung mit Hilfe eines Mörsers und Pistills zerrieben. Der Mörser wurde anschließend mit weiteren 7 ml PBS (und 2% FCS) gespült. Die großen Knochensplitter konnten mit Hilfe einer Filtration (40 µm) von den Zellen getrennt werden. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation der Zellen bei einer Geschwindigkeit von 1800 rpm, einer Temperatur von 4°C für eine Zeitspanne von 5 min. Die Zellen wurden pelletiert und erneut in einem kleinen Volumen von 300 µl PBS-Lösung aufgenommen.

Die Bestimmung der absoluten Zellzahlen jeder isolierten Zellsuspension erfolgte mit Hilfe der Neubauerzählkammer. Die Zellen wurden hierfür 1:10 bis 1:100 mit der Färbelösung Trypanblau zur lebend/tot-Differenzierung verdünnt. Die Zellzahl pro ml der untersuchten Zellsuspension errechnet sich aus dem Mittelwert der vier Großquadrate der Zählkammer. Die ermittelte Zellzahl wurde anschließend mit 10^4 (0,1 µl Volumen der Kammer) multipliziert. Wurde die Probe verdünnt, musste der Verdünnungsfaktor einbezogen werden.

$$\begin{aligned} &\text{Anzahl der Zellen / ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung} \\ &= \text{Zellen pro } \mu\text{l} \end{aligned}$$

Beispiel:

$$\begin{aligned} &150 \text{ Zellen / } 4 \text{ mm}^2 \text{ (Großquadrate) x } 0,1 \text{ mm x } 10 \\ &= 3,75 \times 10^3 \text{ Zellen pro } \mu\text{l} \\ &= 3,75 \times 10^6 \text{ Zellen pro ml} \end{aligned}$$

2.2.2 Blutbilder

Nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurde der Thoraxraum eröffnet und mit Hilfe einer 23G-Nadel und einem EDTA- bzw. Serumröhrchen durch intrakardiale Punktation Blut entnommen. Für die Blutaussstriche wurde jeweils ein Tropfen des Blutes auf einem Objektträger mit Hilfe der geschliffenen Seite eines zweiten ausgestrichen und anschließend im Routinelabor der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen mit der Eosin-Methylenblau-Schnellfärbung nach Wright gefärbt.

Automatisierte Blutbilder, die Auskunft über verschiedene Parameter des Blutes geben, wurden im ZTL des Universitätsklinikums Essen am Scil Vet ABC (engl.: veterinary animal blood counter) bestimmt.

Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten wurden in diesem System über die elektrische Impedanz gemessen. Das Hämoglobin wurde spektroskopisch nachgewiesen.

2.3 Genotypisierung

Jungtiere wurden im Alter von 21 Tagen von ihren Elterntieren und nach Geschlecht voneinander getrennt. Zum gleichen Zeitpunkt erhielten diese Tiere eine gestanzte Ohrlochmarkierung, die ihre Identifikationsnummer darstellte. Zur folgenden Genotypisierung der einzelnen Tiere wurde aus der abgeschnittenen Schwanzspitze DNA isoliert und die jeweilige genetische Transgen-Konstellation mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen.

2.3.1 DNA-Isolierung aus Gewebe und Einzelzellsuspensionen

Die DNA-Extraktion aus der Schwanzspitze folgte einem etablierten Protokoll, das aus drei Schritten besteht.

Initial wurde das Gewebe lysiert und jede Zelle für die Freisetzung der DNA aufgebrochen. Die Zellmembran wurde mit Hilfe von 20 % Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgeschlossen. Der Zusatz von Proteinase K in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml führt zum Abbau der Proteine. Weitere Komponenten des Schwanzlyse-Puffers sind 0,2 M NaCl, 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,1 M des Tris-HCl Puffers und destilliertes Wasser. Die Chelat-Verbindung EDTA fördert den Aufschluss der Zellen, indem es eine Instabilität der Zellmembran und Zell/Zell-Adhäsion durch die Bindung von Ca^{2+} bewirkt. Weiterhin inhibiert EDTA die Aktivität von Nukleasen.

Die Schwanzspitze der Tiere wurde über Nacht bei 55 °C und 1200 rpm in einem Thermomixer in jeweils 500 µl des Puffers verdaut. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und Raumtemperatur (RT) für 15 min., um die unlöslichen Bestandteile der Schwanzspitze zu pelletieren.

Im zweiten Schritt schloss sich die DNA-Präzipitation an. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer negativen Ladung hydrophil, begründet durch die Phosphatgruppen (PO_3^-) entlang des Zucker-Phosphat-Rückgrates. Die positiven Na^+ -Ionen, welche im verwendeten Puffersystem enthalten sind, neutralisieren die negative Ladung der Phosphatgruppen und setzen die Löslichkeit der DNA herab. Mit der Zugabe von 500 µl 100 % Isopropanol wird die Anziehung der Ionen zusätzlich begünstigt und die DNA fällt aus. Das präzipitierte Molekül wurde durch leichtes Invertieren als weiße wolkige Struktur ersichtlich. Es folgte eine weitere Zentrifugation, wobei die vollständige chromosomale DNA pelletiert und der Überstand verworfen wurde.

Zuletzt erfolgte die Reinigung der DNA. Hierfür wurde das Pellet in 1 ml 70 %igen Ethanol gewaschen. Überflüssige Salze werden in diesem Schritt entfernt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wiederum verworfen und das DNA-Pellet getrocknet. Nachdem das Ethanol verdampft war, wurde die DNA in 200 µl H_2O bei 1200 rpm gerüttelt und einer Temperatur von 55 °C innerhalb einer Stunde gelöst.

Die DNA-Isolierung aus einer Einzelsuspension, z. B. Knochenmarkzellen oder Milzzellen, wurde nach dem Protokoll und mit Hilfe der Materialien und Puffersysteme des Qiagen QIAamp® DNA Blood Kit durchgeführt.

Diese Form der Extraktion von Nukleinsäuren basiert auf ihrer Eigenschaft in Gegenwart bestimmter Salze an Silikapartikel zu binden. Die Adsorption der DNA erfolgt während das Zell-Lysat mit Hilfe der Zentrifugalkraft durch die Zentrifugenspinsäulen gepresst wird. Verunreinigungen werden über Waschschriffe entfernt und die DNA im Anschluss eluiert.

Zur Aufreinigung genomischer DNA wurden jeweils 5×10^6 Zellen eines zu untersuchenden Organs verwendet.

Nach erfolgter Isolierung wurde die Konzentration der Nukleinsäuren durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch ermittelt. Diese Art der Konzentrationsbestimmung basiert auf dem Prinzip des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Messvoraussetzungen sind, dass die verwendete Strahlung monochromatisch ist und die gelöst vorliegende absorbierende Substanz weder Lichtstreuung noch Photoreaktion aufweist. Die Absorption eines Lichtstrahles ist dann abhängig von der Konzentration einer Substanz, durch die der Strahl geleitet wird.

Die Formel der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration lautet:

$$\epsilon \times c \times d = a \text{ oder } c = A / (\epsilon \times d)$$

(ϵ = molarer Koeffizient, c = Konzentration; d = Schichtdicke, A = Absorption.)

Nukleinsäuren werden bei 260 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge die aromatischen Ringe der Basen ihr Absorptionsmaximum aufweisen. Die Extinktion von doppelsträngiger DNA ist durch den sogenannten Basenstapelungseffekt geringer als die von einzelsträngiger Nukleinsäure, so dass zur Berechnung von DNA und RNA unterschiedliche Multiplikatoren herangezogen werden. So entspricht 1 OD₂₆₀ einer Konzentration von 40 µg/ml für RNA, während für DNA 1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml gilt. Bestimmte Aminosäurereste (Tryptophan, Tyrosin) absorbieren stark bei einer Wellenlänge von 280 nm. Aufgrund dieser Eigenschaft

wird das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} zur Bestimmung des Proteingehalts und damit zur Bestimmung der Reinheit einer Probe herangezogen.

Die gewonnene DNA wurde im weiteren Verlauf für Polymerase-Kettenreaktionen verwendet.

2.3.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur exponentiellen Vervielfältigung beliebiger DNA-Sequenzen verwendet. In diesem Amplifikationsverfahren ist die *Taq*-Polymerase eine der grundlegenden Komponenten. Erstmals isoliert aus dem in heißen Quellen lebenden Archaeobakterium *Thermus aquaticus* und heute gentechnisch produziert, ist sie thermostabil, was für den Prozess eine essentielle Eigenschaft ist. Diese Polymerase katalysiert, ausgehend von denaturierten Doppelstrangbereichen und spezifisch angelagerten Oligonukleotiden (engl.: *primer*) die Replikation der DNA mit Hilfe der angebotenen Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs). Die PCR-Analyse kann in drei Hauptschritte, die jeweils unterschiedliche Temperaturoptima benötigen, gegliedert werden.

Der erste Schritt beinhaltet die Denaturierung der vorliegenden DNA-Doppelhelix bei 95 °C. Nach Trennung der Stränge lagern sich im zweiten Schritt bei einer Temperatur von 50-60 °C Primer an (Anlagerung; engl.: *annealing*). Durch die Hybridisierung der Primer mit der DNA wird der Startpunkt der Synthese für das DNA-replizierende Enzym und somit für den zu amplifizierenden Bereich festgelegt. Die anschließende Elongation, die Verlängerung der Primer bei 72 °C, führt zur Synthese eines Doppelstrangs. Die *Taq*-Polymerase nutzt die vorliegende DNA als Matrize, um einen komplementären Strang zu produzieren. Denaturierung, *Annealing* und Elongation werden zyklisch wiederholt. Die Wiederholung führt nach dem zweiten Zyklus zu einer Verdopplung des Teilabschnittes der Ursprungs-DNA, der durch die Wahl der Oligonukleotide eingegrenzt wurde. Ein zusätzlich wichtiger Bestandteil der PCR sind Magnesium (Mg)-Ionen, die als Kofaktor der Polymerase fungieren.

Die zur Genotypisierung verwendeten Primer-Paare sind in Tab.7.2 in Kap.7 der Arbeit aufgelistet. Die unterschiedlichen Oligonukleotide wurden entweder aus den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen entnommen (siehe Markierung *) oder die entsprechenden Gensequenzen mit Hilfe der NCBI-Sequenzdatenbank

ermittelt, dem Internetprogramm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entworfen und durch die Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Alle durch neu entworfene Primer generierten PCR-Amplifikate wurden durch anschließende DNA-Sequenzierung am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen verifiziert. Die exakten PCR-Protokolle sind in Kap.7 der vorliegenden Arbeit aufgeführt.

2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Geladene Teilchen wandern in einem elektrischen Feld zum Pol der entgegengesetzten Ladung. Das DNA-Rückgrat trägt negative Ladungen und wandert dementsprechend zur Anode. In einem Medium wie dem Agarosegel kann die DNA entsprechend ihrer Länge (in Basenpaaren; bp) aufgetrennt werden. Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid. Die molekulare Struktur eines Agarosegels fungiert als Matrix, die für größere Moleküle schwerer zu passieren ist als für kleinere. Aufgrund dessen wandern kleinere Fragmente schneller und weiter durch die Agarose. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist in einem Agarosegel proportional zu ihrer Größe. Die Dichte der Matrix und damit das Auflösungsvermögen kann durch die Wahl der Agarosekonzentration variiert werden. Zur Analyse der Genotypisierungs-PCR und Cre-vermittelten Rekombinationsnachweise wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,5% (w/v) in einem TAE-Puffersystem verwendet. Die Agarose wurde in dem entsprechenden Puffer aufgekocht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EthBr) versetzt und anschließend in eine Gießapparatur gegossen. EthBr, ein rötlich gefärbter Fluoreszenzfarbstoff, interkaliert bedingt durch seine planare Struktur in die DNA-Doppelhelix. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (um 300 nm) wird die konzentrierte Fluoreszenz (590 nm) der EthBr-gefärbten DNA-Fragmente detektierbar.

Die PCR-Produkte wurden mit einem blauen Ladepuffer versehen und bei einer Spannung von 80 Volt aufgetrennt. Der den Proben beigefügte Ladepuffer dient den Verlauf der Elektrophorese zu folgen und der Beschwerung der Proben mittels Glycerin, um das Verflüchtigen aus den Taschen des Gels zu verhindern. Die Gelelektrophorese wurde in einer entsprechenden Apparatur und mit einem

entsprechenden Stromversorger durchgeführt. Ein Größenstandard (ϕ X174 RF DNA / Hae III *fragments*) ermöglichte die Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente abzuschätzen. Die Auswertung der Gelelektrophoresen erfolgte mit Hilfe des BioDocAnalyze-Systems, das aus einem Transilluminator TI5, der entsprechenden Kamera mit zusätzlichem Orangefilter, der Software und einem Drucker der Firma Biometra bestand.

2.4 Nachweis Cre-vermittelter Rekombinationen

Die Rekombination der loxP-flankierten Allele in den transgenen Tieren wurde auf genomischer Ebene nachgewiesen (Primer und Protokolle der jeweiligen PCR-Nachweise in Kap.7). Das resultierende Amplikon wurde auf seine vorhergesagte Sequenz überprüft. Hierfür wurde das amplifizierte Produkt aus dem Agarosegel isoliert, aufgereinigt und zur Sequenzierung (Institut für Humangenetik) gegeben. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der Sequenzierung durch das Programm NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) validiert.

2.4.1 DNA-Gelextraktion

Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde nach dem Protokoll und mit Hilfe der Materialien und Puffersysteme des Qiagen QIAquick® Gel Extraction Kit durchgeführt. Ähnlich der DNA-Isolierung aus Einzelzellsuspensionen erfolgt die Extraktion der DNA über ihre Adsorption an eine Silikamembran.

2.4.2 DNA-Sequenzierung

Die Durchführung der DNA-Sequenzierung erfolgte durch den Sequenzierservice des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen.

Ausgehend von der amplifizierten DNA-Sequenz wird eine PCR-verwandte Reaktion zur Sequenzierung nach Sanger durchgeführt. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix wiederum mittels Hitze denaturiert. Die für das Amplikon verwendeten Primer werden hier jedoch einzeln eingesetzt, wodurch die DNA linear amplifiziert wird. Die Oligonukleotide lagern sich an, und anstatt zum Aufbau der komplementären Stränge nur dNTPs zur Verfügung zu stellen, werden zusätzlich

im Überschuss fluoreszenzmarkierte 2'-3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTP) zugegeben. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt und die Nukleotide können somit zusammen in einem Ansatz verwendet werden. Diese „Kettenabbruch“-ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe: Nach dem Einbau eines ddNTPs in den neusynthetisierten Strang ist es der Polymerase nicht möglich eine Verknüpfung mit der Phosphatgruppe zum nächsten Nukleotid zu erstellen, die Synthese bricht ab. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mit einem der markierten ddNTPs enden. Diese Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTP-Konjugate am Ende jedes DNA-Fragmentes emittieren in ihrer spezifischen Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale (das Chromatogramm) wird in die Basensequenz der DNA übersetzt.

2.5 mRNA-Expressionsnachweise

Die mRNA-Expression der Zielgene des Hedgehog-Signalweges und auch die durch das transgene System beeinflusste Expression des Smoothed-Rezeptors wurden mit Hilfe semi-quantitativer Analysen untersucht. Für die konventionelle PCR (siehe Kap.2.3.2) wurde komplementäre DNA (cDNA) aus der RNA des zu untersuchenden Organs der Tiere generiert. Die Primer (siehe Kap.7, Tab.7.4 und Tab.7.5) für die zu amplifizierenden Transkripte, überspannten, wenn möglich, ein Intron des zu detektierenden Gens. Eine Ausnahme stellt die endogene Kontrolle der quantitativen Analyse Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dar.

Quantitative Nachweise der Expression wurden mit Hilfe der *real-time* RT-PCR, ebenfalls ausgehend von revers transkribierter mRNA, im BioChip Labor des IFZ (Institut für Zellbiologie; PD Dr. Ludger Klein-Hitpass) am Universitätsklinikum in Essen mit Hilfe der Applied Biosystems TaqMan[®] Assays durchgeführt.

2.5.1 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe

Die RNA-Isolierung aus einer Einzelzellsuspension wurde nach dem Protokoll und mit Hilfe der Materialien und Puffersysteme des Qiagen RNeasy® Mini Kit durchgeführt.

Das Prinzip dieser Methode ist ähnlich der Extraktion genomischer DNA. Einzelzellsuspensionen, hier von 1×10^7 Zellen der jeweiligen Organe, wurden in der Gegenwart eines stark denaturierenden Guanidiniumisothiocyanat (GITC)-haltigen Puffers und Mercaptoethanol lysiert. Der Zusatz von GITC hat die sofortige Inaktivierung potentiell vorhandener RNasen zur Folge, die die Isolierung intakter RNA beeinflussen würden. Die optimalen Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silikamembran werden durch das beigefügte Ethanol gegeben. Um die Verunreinigung durch DNA auszuschließen, wurde ein zusätzlicher DNA-Verdau-Schritt (RNase-Free DNase Set; Qiagen) durchgeführt. Die Qualität und Konzentration der RNA wurden anhand einer photometrischen Messung, wie oben beschrieben, bestimmt. Von der isolierten Gesamt-RNA wurde in Folge die *messenger* RNA (mRNA; dt.: Boten-RNA) zur Generierung von komplementärer cDNA verwendet.

2.5.2 cDNA-Generierung

Einzelsträngige RNA kann mit Hilfe sogenannter reverser Transkriptasen (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Reverse Transkriptasen stammen ursprünglich aus Retroviren, hier aus dem MML (engl.: *Moloney murine leukemia*)-Virus, die ihr RNA-Genom in DNA umschreiben, um sie in das Wirtsgenom integrieren zu können. Die Synthese der cDNA folgt dem Prinzip der PCR (siehe Kap.2.3.2). Die RT ist eine katalysierende RNA-abhängige Polymerase, die gleichzeitig eine RNase H Aktivität besitzt, die RNA in DNA-RNA-Heteroduplexen abbaut. Bei der Erststrang-Synthese benötigt die RT als Startsequenz Oligo (dT)-Primer. Diese binden an den PolyA-Terminus der mRNA. Beigefügte rekombinante RNase-Inhibitoren und dNTPs in einem geeigneten Puffersystem vervollständigen den Reaktionsansatz. Zur cDNA-Generierung wurde das Advantage®RT-for-PCR Kit der Firma ClonTech verwendet.

2.5.3 *real-time* RT-PCR (Applied Biosystems *Gene expression systems*)

Die Nutzung der *real-time* (dt.: Echtzeit) RT-PCR, um cDNA-Produkte zu amplifizieren ist eine Methode, um die Expression von Genen unter verschiedenen Einflüssen zu quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des jeweiligen Transgens oder des konditionalen *knockout* eines Gens nachgewiesen werden.

Die quantitative Analyse ist nur dann aussagekräftig, wenn die relativen Unterschiede der Expression eines Gens im Vergleich zu einer endogenen Referenz betrachtet werden. Hierfür dienen *house keeping* (dt.: Haushalts)-Gene, welche unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine konstante Expression aufweisen [z. B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)]. *House keeping*-Gene sind in allen Zelltypen vorhanden und für das Wachstum und Überleben der Zelle notwendig. Neben der endogenen Kontrolle wird eine NTC (*no template control*; ein Ansatz ohne DNA) mitgeführt. Für jeden Reaktionsansatz wurden 1-100 ng cDNA (Synthese siehe Kap.2.5.2) verwendet. Jede Probe wurde in Dreifachansätzen gemessen.

Der TaqMan[®] Assay (Auflistung der verwendeten Assays siehe Kap.7, Tab.7.5) macht sich die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase zu Nutze. Eine spezielle Sonde, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, hybridisiert während einer PCR (Kap.2.3.2) zusammen mit den Primern, hier z. B. Smo-spezifisch, an den Matrizenstrang. Das 3'-Ende der Sonde ist mit einem Rhodamin-Derivat, der als Quencher-Farbstoff fungiert, besetzt und mit einem Phosphatrest blockiert. Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, so unterdrückt der Quencher aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Reporter-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) die Fluoreszenz des Reporters. Während der Elongation trifft die *Taq*-Polymerase auf die Sonde und verdrängt sie. Es entsteht eine Y-förmige Struktur, wodurch die Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Freie Sonden, die nicht hybridisiert sind, werden nicht hydrolysiert. Kommt es jedoch zur Hydrolyse der Sonde, wird der FET unterbrochen und entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts steigt das Fluoreszenzsignal des Reporters mit jedem Zyklus an (Abb.2.11).

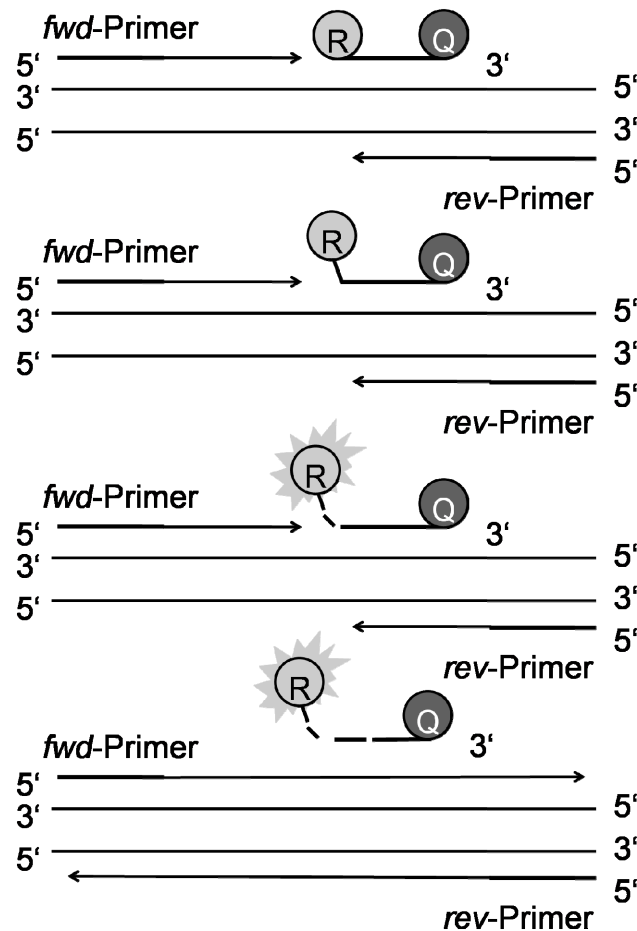


Abb.2.11: Schematische Darstellung eines TaqMan-Systems. Eine Sonde, versehen mit einem Reporter-Molekül sowie einem Quencher-Farbstoff, hybridisiert an die für sie komplementäre DNA-Sequenz. Die Fluoreszenz des Reporters wird solange von dem Quencher unterdrückt, bis die Polymerase während der Elongation die Sonde verdrängt und diese schneidet. Der Reporter-Farbstoff fluoresziert (nach www.appliedbiosystems.com).

Zur Quantifizierung der *real-time* RT-PCR-Ergebnisse wurde der δCt -Wert aus den Ct (engl.: *cycle threshold*)-Werten des Zielgens und der endogenen Kontrolle (GAPDH) berechnet. Der $\delta\delta\text{Ct}$ -Wert entspricht der Differenz aus den δCt -Mittelwerten der transgenen Tiere und der jeweiligen Kontrollgruppe. Die relative Expression wurde über die Formel $2^{-\delta\delta\text{Ct}}$ errechnet und dargestellt.

2.6 Durchflusszytometrie

Der methodische Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Durchflusszytometrie. Bei einem Durchflusszytometer handelt es sich um ein Gerät, das in der Lage ist, kleine Partikel, in diesem Fall Zellen, anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung zu unterscheiden. Die Voraussetzung zur Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen ist die zielgerichtete Markierung bestimmter zellulärer Strukturen. In der vorliegenden Arbeit steht die Markierung der Zellen mit Hilfe Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter (direkte Markierung) Antikörper bzw. fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper (indirekte Markierung) im Mittelpunkt.

Die exakte Identifikation des Antigens durch einen Antikörper, die Antigen-Antikörper-Bindung, macht sich die Durchflusszytometrie zu Nutze. Monoklonale rekombinante Antikörper, die gegen unterschiedliche inter- und intrazelluläre Antigene gerichtet sind, werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) gekoppelt. So kann die Bindung des Antikörpers an sein Antigen direkt nachgewiesen werden. Nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (engl.: *Excitation*) emittiert der gebundene Farbstoff Licht in einem für ihn charakteristischen Wellenlängenbereich. Fluorochrome, die hier zum Einsatz kamen, sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 750 und Pacific Blue®, ein Farbstoff basierend auf dem 6,8-Difluoro-7-Hydroxycoumarin-Fluorophor, zudem gekoppelte Tandem-Farbstoffe, wie Peridinin Chlorophyllprotein (PerCP)-Cyanin 5.5 (Cy5.5), PE-Cy7, APC-Cy7 und APC-eFlour®780.

Grundlegender Bestandteil eines Durchflusszytometers ist der Laser (engl.: *light amplification by stimulated emission of radiation*). Gekennzeichnet ist ein energiereicher Laserstrahl dadurch, dass die Laserstrahlwellen einen hohen Grad an Gleichphasigkeit (Kohärenz) besitzen, stark gebündelt sind und für jeden Lasertyp eine charakteristische, nahezu konstante Wellenlänge (monochromatisches Licht) besitzen. Dieses Licht wird mit Hilfe einer Fokussierungslinse gebündelt und trifft in der Messküvette auf den laminaren Probenstrom (Abb.2.12).

Die verwendeten Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II und BD™LSR II (BD Biosciences) weisen jeweils einen blauen Argonionenlaser (Coherent Sapphire™)

mit einer Wellenlänge von 488 nm auf, der die Fluorochrome FITC, PE, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5 und Alexa Fluor® 488 anregt, sowie einen roten Helium-Neon-Laser (JDS Uniphase 1344P) von 633 nm, der APC, APC-Cy7, Alexa Fluor® 647 und Alexa Fluor® 750 und APC-eFlour®780 anregt. Das LSR II-Durchflusszytometer besitzt einen zusätzlichen violetten Laser (Coherent Radius™405), der das Antikörper-konjugierte Fluorochrom Pacific Blue® und den direkten DNA-Farbstoff DAPI anregt.

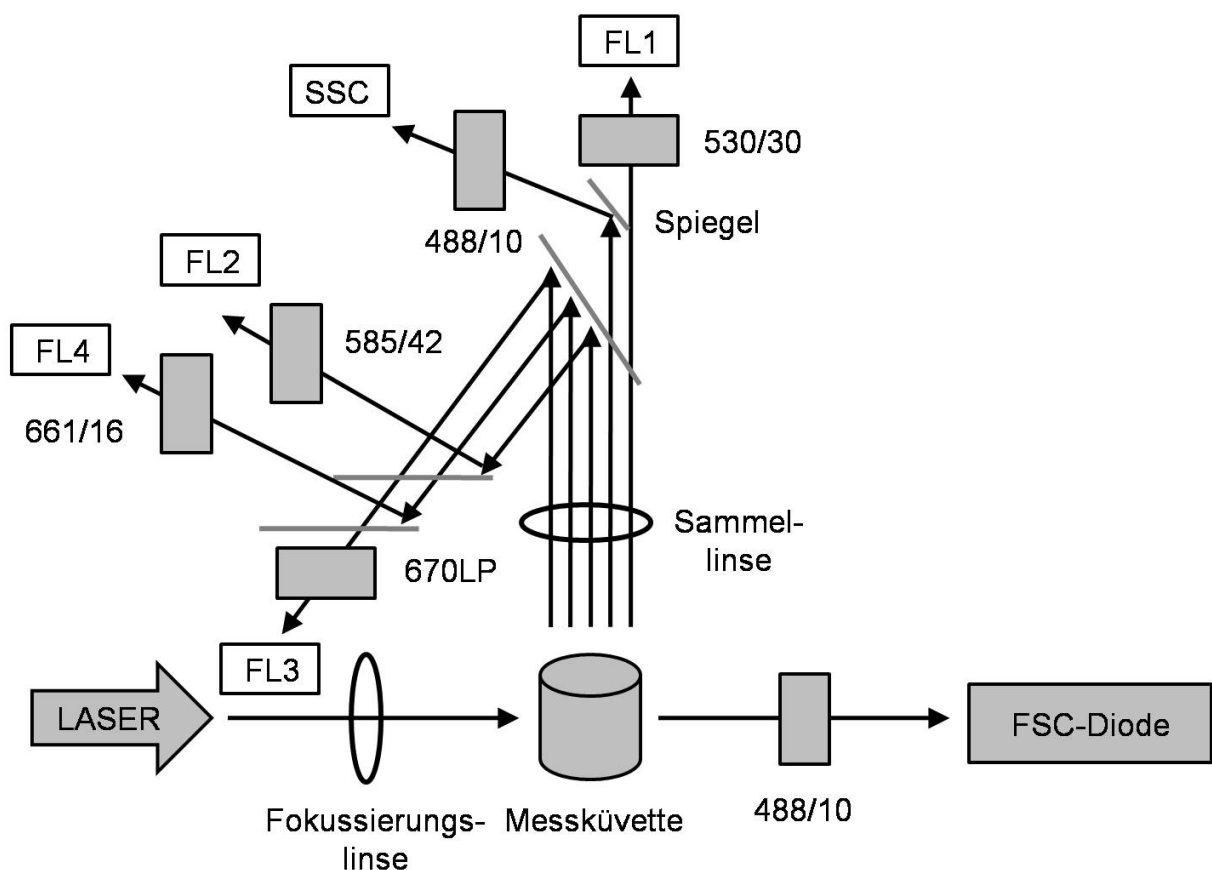


Abb.2.12: Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflusszytometers.

Fokussiertes Licht eines Lasers trifft in einer Messküvette den laminaren Probenstrom. Das Licht wird gestreut und reflektiert; und Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht verschiedener Wellenlängen. Ein System aus verschiedenen Filtern und Spiegeln trennt dieses Licht nach seinen Wellenlängenbereichen, die der jeweilige Detektor registriert. LP, Langpass-Filter; FSC, *forward scatter*, SSC, *side scatter*, FL1-4, Detektoren (Luttmann W., 2006).

Trifft das Licht des Lasers auf eine singuläre Zelle, die vereinzelt an ihm vorbeifließt, wird es gestreut und reflektiert. Streuung und Reflektion geben Aufschluss über die Größe bzw. die Granularität der Zelle. Zur Generierung dieses

sogenannten *forward scatter* (FSC; dt.: Vorwärtsstreulicht) und *side scatter* (SSC; dt.: Seitwärtsstreulicht) Signals wird der blaue Laser verwendet (Abb.2.13).

Ein Teil der Lichtenergie des Laserstrahls wird durch das entsprechende Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge emittiert. Weitere Linsen des optischen Systems sammeln die emittierten Strahlen, und verschiedene Spiegel teilen sie auf (Abb.2.12). Zur spezifischen Detektion der einzelnen Fluoreszenzen werden optische Filter benötigt.

Es existieren drei unterschiedliche Formen der optischen Filter: Der Langpass-, der Kurzpass- und der Bandpass-Filter. Der Langpass-Filter lässt ab einer bestimmten Wellenlänge langwelliges Licht passieren und schließt kurzwelligeres Licht aus, während der Kurzpass-Filter kurzwelliges Licht weiterleitet und ab einer festgelegten Wellenlänge langwelligeres Licht aussperrt. Der Bandpass-Filter ist eine Kombination aus Kurz- und Langpass-Filter. Dieser Filter lässt wiederum von einer bestimmten Wellenlänge aus ein festgelegtes Spektrum lang- und kurzwelliges Licht passieren.

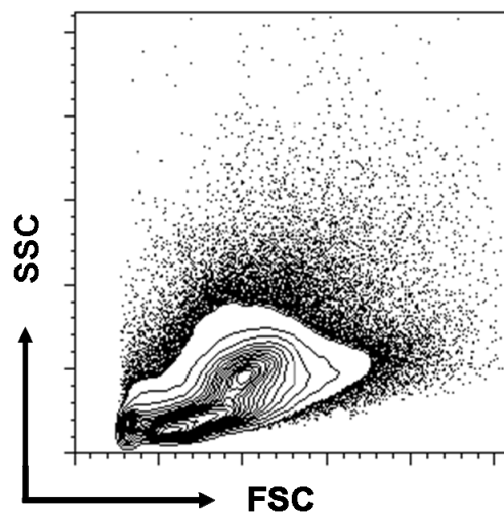


Abb.2.13: FSC/SSC Kontur-Plot-Auftragung der Signale von Knochenmarkzellen einer C57BL/6-Maus. Die Signale sehr kleiner Zellen, wie z. B. Erythrozyten, befinden sich nah des Nullpunktes von x- und y-Achse. Je stärker das FSC-Signal, desto größer ist die detektierte Zelle, je intensiver das SSC-Signal, desto granulärer.

Das LSR II und das FACSCanto™ II-Durchflusszytometer verwenden diese dichroitischen Filter (Kurz-, Lang- und Bandpassfilter), die Fluoreszenzlicht einer spezifischen Wellenlänge zu ihren entsprechenden Detektoren (Photodiode und engl.: *photomultiplier tubes*; PMTs sind spezielle Elektronenröhren die einzelne

Photonensignale verstärken können) leiten. Das optische Signal wird in den jeweiligen Detektoren in einen elektrischen Impuls umgewandelt und vom elektronischen System erfasst und durch die Software (BD FACSDiva) dargestellt. Im verwendeten System war es möglich, acht unterschiedliche Fluorochrome zur Färbung von Zellpopulationen zu nutzen, demnach acht unterschiedliche Antigene auf ihrer Oberfläche oder intrazellulär zu markieren und die einzelnen Zellen zu identifizieren (Tab.2.1).

Tab.2.1: Tabellarische Zusammenstellung einer Fluorochrom-Kombination, die für eine Zellfärbung verwendet und mit dem LSR II-Durchflusszytometer analysiert werden kann.

Fluorochrom	Anregung/Laser	Bandpassfilter (nm)	Emission (Maximum)
FITC	488 nm, blauer Laser	530/30	519 nm
PE	488 nm, blauer Laser	575/26	578 nm
PE-Cy7	488 nm, blauer Laser	780/60	785 nm
PerCP-Cy5.5	488 nm, blauer Laser	695/40	695 nm
APC	633 nm, roter Laser	660/20	660 nm
APC-Cy7	633 nm, roter Laser	780/60	785 nm
PB	405 nm, violetter Laser	440/40	452 nm

Die Analyse der mit Hilfe des Durchflusszytometers generierten Akquisitionsdateien wurde mit der FlowJo-Flow Cytometry Analysis Software (Tree Star) durchgeführt. Dieses Computerprogramm ermöglicht die Darstellung jeder detektierten Zelle und Zellpopulation in unterschiedlichen Formen. Die in dieser Arbeit vorherrschende Darstellungsform ist der *Contour plot* (dt.: graphische Darstellung als Kontur). Es existieren jedoch weitere Darstellungsmöglichkeiten, wie z. B. die Abbildung der Signale als *Dot plot* (dt.: Punkt), *Pseudocolour plot* (dt.: Falschfarbe) oder *Density plot* (dt.: Dichte). Eine Population kann ebenfalls eindimensional in Form eines Histogramms abgebildet werden.

2.6.1 Oberflächenfärbung von Zellen

Ziel der Oberflächenfärbung ist der Nachweis unterschiedlicher Zellpopulationen durch die spezifische Kombination von Molekülen, die auf der Oberfläche der

Zellen vorhanden sind. Ein B-Lymphozyt kann z. B. anhand des Glykoproteins B220 (220 kDa) auf seiner Oberfläche identifiziert werden. Ein T-Lymphozyt hingegen kann anhand des T-Zellrezeptors identifiziert werden, der mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen TcR β oder CD3e detektiert werden kann. Weitere Oberflächenphänotypen, die in dieser Arbeit von Relevanz sind und auf die im Teil Ergebnisse näher eingegangen wird, finden sich in Tab.2.2.

Tab.2.2: In der Durchflusszytometrie relevante Oberflächenphänotypen unterschiedlicher Zellkompartimente.

Zelltyp	Oberflächenphänotyp	Literatur
hämatopoetische Progenitoren im Knochenmark		
LT-HSC	lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺ CD34 ⁻ Flk-2 ⁻	(Spangrude et al., 1988)
ST-HSC	lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺ CD34 ⁺ Flk-2 ⁻	(Spangrude et al., 1988)
MPP	lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺ CD34 ⁺ Flk-2 ⁺	(Spangrude et al., 1988)
CLP	lin ⁻ Sca-1 ^{low} c-kit ^{low} IL7R α ⁺	(Kondo et al., 1997)
CMP	lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁺ CD16/CD32 ⁺	(Akashi et al., 2000)
GMP	lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁺ CD16/CD32 ^{hi}	(Akashi et al., 2000)
MEP	lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁻ CD16/CD32 ^{low}	(Akashi et al., 2000)
B-Zellentwicklung im Knochenmark (nach Hardy)		
pre- pro B Zellen Fr. A	B220 ⁺ CD43 ⁺ BP-1 ⁻ CD24 ⁻	(Hardy und Hayakawa, 2001)
pro B-Zellen Fr. B/C	B220 ⁺ CD43 ⁺ BP-1 ^{-/+} CD24 ⁺ CD19 ⁺	(Hardy und Hayakawa, 2001)
pre B-Zellen Fr. C'	B220 ⁺ CD43 ⁺ BP-1 ⁺ CD24 ^{hi}	(Hardy und Hayakawa, 2001)
pre B-Zellen Fr. D	B220 ⁺ CD43 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻	(Hardy und Hayakawa, 2001)
unreife B-Zellen Fr. E	B220 ⁺ CD43 ⁺ IgM ⁺ IgD ^{-/low}	(Hardy und Hayakawa, 2001)
reife B-Zellen Fr. F	B220 ⁺ CD43 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	(Hardy und Hayakawa, 2001)
B-Zellen in der Milz		

B-Zellen	B220 ⁺ CD19 ⁺	(Allman et al., 1999)
follikuläre 1 B-Zellen	B220 ⁺ AA4.1 ⁻ CD23 ⁺ CD21/35 ^{int} IgM ^{int} IgD ⁺	(Allman und Pillai, 2008)
follikuläre 2 B-Zellen	B220 ⁺ AA4.1 ⁻ CD23 ⁺ CD21/35 ^{int} IgM ^{hi} IgD ⁺	(Allman und Pillai, 2008)
<i>transitional</i> 1 B-Zellen	B220 ⁺ AA4.1 ⁺ CD23 ⁻ IgM ^{hi} IgD ^{low}	(Allman und Pillai, 2008)
<i>transitional</i> 2 B-Zellen	B220 ⁺ AA4.1 ⁺ CD23 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{low}	(Allman und Pillai, 2008)
<i>transitional</i> 3 B-Zellen	B220 ⁺ AA4.1 ⁺ CD23 ⁺ IgM ⁻ IgD ^{low}	(Allman und Pillai, 2008)
Marginalzonen- B-Zellprogenitoren	B220 ⁺ AA4.1 ⁻ CD23 ⁺ CD21/35 ⁺ IgM ^{hi}	(Allman und Pillai, 2008)
Marginalzonen- B-Zellen	B220 ⁺ AA4.1 ⁻ CD23 ⁻ CD21/35 ⁺ IgM ^{hi}	(Allman und Pillai, 2008)
Plasmazellen	CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD21/35 ⁻ F4/80 ⁻ CD28 ⁺ CD138 ^{hi}	(Cheung et al., 2004; Delogu et al., 2006)
T-Zellentwicklung im Thymus		
DN1	CD4 ⁻ CD8 ⁻ lin ⁻ TcRβ ⁻ CD25 ⁻ CD44 ⁺	(Zlotnik et al., 1992)
DN2	CD4 ⁻ CD8 ⁻ lin ⁻ TcRβ ⁻ CD25 ⁺ CD44 ⁺	(Zlotnik et al., 1992)
DN3	CD4 ⁻ CD8 ⁻ lin ⁻ TcRβ ⁻ CD25 ⁺ CD44 ⁻	(Zlotnik et al., 1992)
DN4	CD4 ⁻ CD8 ⁻ lin ⁻ TcRβ ⁻ CD25 ⁻ CD44 ⁻	(Zlotnik et al., 1992)
reife T-Zellen	CD4 ⁺ oder CD8 ⁺ CD3 ⁺ TcRβ ⁺	{Arase, 1990 638 /id; Ogasawara, 1990 11 /id}
ISP Zellen	CD8 ⁺ TcRβ ^{low}	(Godfrey und Zlotnik, 1993)
Erythropoese im Knochenmark		
Proerythroblasten	CD71 ⁺ Ter119 ^{int} c-kit ^{low}	(Socolovsky et al., 2001)
basophile Erythroblasten	CD71 ⁺ Ter119 ⁺	(Socolovsky et al., 2001)
basophile/polychromatische Erythrozyten	CD71 ^{int} Ter119 ⁺	(Socolovsky et al., 2001)
orthochromatische/oxiphile Erythrozyten	CD71 ⁺ Ter119 ⁺	(Socolovsky et al., 2001)
Ery.A	CD71 ⁺ Ter119 ⁺ FSC ^{hi}	(Liu et al., 2006)
Ery.B	CD71 ⁺ Ter119 ⁺ FSC ^{low}	(Liu et al., 2006)

Ery.C	CD71 ⁺ Ter119 ⁺ FSC ^{low}	(Liu et al., 2006)
weitere Zellpopulationen		
natürliche Killerzellen	Nk1.1 ⁺	(Ballas und Rasmussen, 1990)
Granulozyten	Gr-1 ^{hi} Mac-1 ^{hi}	(Lagasse und Weissman, 1996)
Monozyten	Gr-1 ^{low} Mac-1 ^{hi}	(Lagasse und Weissman, 1996)
dendritische Zellen	CD11c ⁺	(Metlay et al., 1990)
Megakaryozyten	CD41 ⁺	(Murphy und Leavitt, 1999)

Der Antikörper-Färbung der Zellen ging die Organentnahme der Versuchstiere voraus, wie sie unter Kap.2.2.1 beschrieben ist. Pro Färbung wurden 2×10^6 Zellen eingesetzt, die in die Vertiefung einer 96er Rundbodenplatte pipettiert und in 100 µl αCD16/CD32 Mausblock in PBS-Puffer aufgenommen wurden. Bei αCD16/CD32 handelt es sich um einen Antikörper ohne gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, der gegen den Fc-Rezeptor der Maus gerichtet ist. Die Zellen wurden 15 min. auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Die Inkubationen der folgenden Färbeschritte wurden ebenfalls auf Eis und in Dunkelheit durchgeführt, da einige der Fluorochrome lichtempfindlich sind. Nach dem sogenannten Abblocken der Zellen wurden die Zellen bei 1800 rpm für 5 min. bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in 40 µl der Antikörpermixtur aufgenommen. Die Zellen wurden 30 min. inkubiert, danach in 150 µl PBS-Puffer gewaschen und erneut resuspendiert. Wenn ein Biotin-gekoppelter Antikörper verwendet wurde, war es notwendig einen zweiten Färbeschritt von 15 min. mit einem Streptavidin-Fluorochrom-Konjugat vorzunehmen. Biotin bindet hoch spezifisch Streptavidin und bietet den Vorteil in mehreren Fluoreszenzkanälen ausgelesen werden zu können.

Nach dem letzten Färbe- und Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl PBS-Puffer in ein Probenröhrchen aufgenommen. Zusätzlich im Puffer enthalten war ein Vitalitätsmarker, wie DAPI oder Propidiumiodid. Beide Farbstoffe interkalieren, wie EthBr, in Nukleinsäuren und geben demnach Aufschluss über den Zustand der Zelle. Ist die Membran einer Zelle aufgrund von Apoptose oder Nekrose defekt, kann der Marker eindringen und die DNA anfärben.

Die durchflusszytometrische Identifikation jedes Zellkompartimentes wurde mit der Selektion der lebenden Zellen über einen Marker eingeleitet. Es folgte der Ausschluss von Zellaggregaten über die Einstellung *width* (dt.: Weite) und eine anschließende Analyse von mindestens 200.000 Zellen. Die Anzahl der Zellen einer detektierten Population wurde prozentual zu allen lebenden analysierten Zellen angegeben. Die absoluten Zellzahlen einer Population im jeweiligen Organ wurden aus der Gesamtzellzahl der Organe, ermittelt durch Auszählen der Zellen per Neubauerzählkammer, und den prozentualen Anteil der lebenden Zellen errechnet.

2.6.2 Titration, Isotypkontrollen und Kompensation

Bei der Färbung von Zellen mit Antikörperkonjugaten sind unterschiedliche Faktoren zu beachten. Wichtig bei der Wahl der verschiedenen Konjugate ist, dass alle Antikörper in einer Färbung mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind, es sei denn, es soll durch die Mehrzahl der in diesem Fluoreszenzkanal verwendeten Antikörper die gesuchte Population negativ selektiert werden (Abb.2.14).

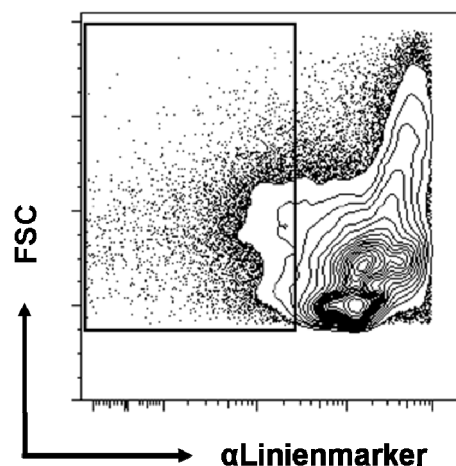


Abb.2.14: Kontur-Plot-Darstellung von Knochenmarkszellen und der negativen Selektion einer Population am Beispiel der sogenannten Linien-Färbung. Alle reifen hämatopoetischen Zellen werden anhand eines spezifischen Oberflächenmolekül-musters identifiziert. Die Antikörper gegen die unterschiedlichen Oberflächenmoleküle der reifen Zellen sind mit demselben Fluorochrom gekoppelt, so dass die positiven Zellen in einem Kanal gemeinsam zu identifizieren und für die Analyse von Progenitoren auszuschließen sind (siehe Kasten; engl.: *gate*).

Um zu verhindern, dass der verwendete Antikörper im Versuch in zu hoher oder zu niedriger Konzentration vorliegt, wurde jeder Antikörper vor Gebrauch titriert. Hierfür wurde der Antikörper unterschiedlich in PBS-Puffer verdünnt. Die Zellen des Gewebes von Interesse wurden mit dem in einer Verdünnungsreihe angesetzten Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Anhand der Verdünnungen war es möglich, eine Aussage über die optimale Arbeitskonzentration des Antikörpers zu machen, in welcher Konzentration er gesättigt vorliegt, was bedeutet, dass das Verhältnis von Antikörper und Antigen ausgeglichen ist. Nimmt die Intensität des Fluorochromsignals ab, je niedriger konzentriert der Antikörper, ist dies ein Hinweis darauf, dass die angebotene Antikörpermenge nicht ausreichend ist, die Anzahl der vorliegenden Antigene auf der Oberfläche der Zellen zu sättigen (Abb.2.15).

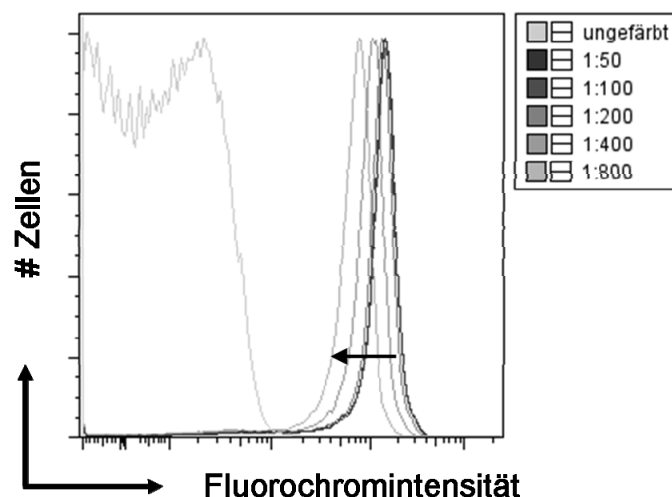


Abb.2.15: Titration eines Fluorochrom-markierten Antikörpers. In der Farbe Hellgrau sind die Signale der negativen, ungefärbten Zellen aufgetragen, rechts die des schrittweise verdünnten Antikörperkonjugats, dessen Intensität im Laufe der fünf Verdünnungsschritte (1:50-1:800) abnimmt. Bis zur Verdünnung von 1:200 liegt hier der Antikörper in ausreichender Menge vor, um die dargebotenen Antigene zu sättigen.

Ein weiterer Punkt ist die Spezifität des Antikörpers. Ob das gewählte Antikörperkonjugat unspezifisch über seinen Isotypen (z. B. IgG₁) bindet, kann nur durch die Verwendung einer Isotypkontrolle geklärt werden. Eine Isotypkontrolle ist ebenfalls ein Antikörper, der gegen Antigene eines fremden Organismus gerichtet ist und der denselben Isotypen, wie den des Test-Antikörpers, aufweist. Verursacht die Isotypkontrolle ein Signal, wird dieses unspezifische Signal von dem des Antigen-spezifischen Antikörpers subtrahiert oder als Ratio ins Verhältnis

gesetzt. Ursache für unspezifische Signale können z. B. Bindungen an Fc-Rezeptoren sein oder nicht fassbare physikalisch-chemische Eigenschaften eines monoklonalen Antikörperkonjugates.

Für eine aussagekräftige durchflusszytometrische Datenanalyse ist die Kompensation von großer Bedeutung. Da die Emissionsspektren der unterschiedlichen Fluorochrome sich über einen weiten Bereich um dessen Maximalwert erstrecken, kommt es zur Überlappung der Emissionswellenlängenbereiche. Ohne Kompensation führt diese Überlappung zu falsch positiven Signalen. Bei PE und FITC beispielsweise würde der PE-Detektor Anteile des von FITC emittierten Lichtes registrieren. Umgekehrt werden im FITC-Detektor PE-Signale erfasst. Ziel ist es, durch Kompensation, die Einstellung der Detektoren dahingehend zu verändern, dass die Überlappung der Spektren herausgefiltert wird.

Praktisch bedeutet dies für die Kompensation, die zu untersuchenden Zellen nicht nur mit zwei bis acht Farben gleichzeitig anzufärben, sondern zusätzlich mit jeweils nur einem der verwendeten Fluorochrome („Einzelfarbe“). Die Emission des einzelnen Farbstoffes wird benötigt, um die Kompensationseinstellungen vorzunehmen, so dass im Anschluss die unterschiedlichen Fluorochrom-Signale in der Mixtur exakt voneinander getrennt werden können.

Anhand ungefärbter Zellen, die als negative Zellpopulation in allen Kanälen verwendet werden, und der Eingabe der Einzelfärbungen berechnet die BD FACSDIVA-Software die nötigen Einstellungen, um im weiteren Verlauf die Emissionen der einzelnen Kanäle korrekt zuzuordnen.

2.7 Colony Forming Cell (CFC)-Assays

Ein CFC- oder auch CFU (engl.: Colony Forming Cell or Unit)-Nachweis wird für die Untersuchung der Quantität und Funktionalität hämatopoetischer Progenitoren in Knochenmark, Milz, fötaler Leber oder peripherem Blut verwendet. In einem optimierten Medium der Firma StemCell Technologies MethoCult®3434 oder MethoCult®3334 wurden die Proliferationseigenschaften von hämatopoetischen Progenitoren, also die Möglichkeit zur Ausbildung einer Kolonie der Erythrozyten- (CFU-E, BFU-E), Granulozyten-Makrophagen- (CFU-GM, CFU-G, CFU-M) und

auch der multipotenten Granulozyten-, Erythrozyten-, Makrophagen- und Megakaryozyten (CFU-GEMM)-Vorläufer untersucht. In einem Methylzellulose-Medium fördern die zugefügten Wachstumsfaktoren, wie z. B. Erythropoietin oder Interleukin 6, das Wachstum bestimmter Kolonien.

Im Versuch wurden Zellen von Knochenmark oder Milz der Tiere steril nach dem StemCell Technologies-Protokoll verarbeitet. Die Kultivierung von 2×10^4 (MethoCult®3334) oder $2,5 \times 10^4$ (MethoCult®3434) Zellen/ml Medium, in einem Dreifachansatz pro Maus, wurde in einer 6er Flachbodenplatte durchgeführt, deren Innenkammer mit PBS gefüllt wurde, um die Austrocknung des Mediums während der Inkubation zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für zwei (CFU-E), fünf (BFU-E) und sieben (CFU-GEMM) Tage.

Die resultierenden Kolonien wurden nach Anleitung der Firma StemCell Technologies mikroskopisch differenziert und ausgezählt.

2.8 Gewebeschnitte

Bei auffälligem Habitus der Tiere oder beim Auftreten neurologischer Auffälligkeiten wurde bei bestimmten Tieren (siehe Kap.3) das Gehirn präpariert und in 4,5 % gepufferter Formaldehydlösung fixiert. Auch Teilbereiche der Haut, die Läsionen aufwiesen, wurden fixiert. Des Weiteren wurden Tieren Milz und Thymus entnommen, die bei gegebener Fragestellung histologisch untersucht werden sollten.

Das Institut für Pathologie und Neuropathologie (Dr. med. Florian Grabellus) bearbeitete die behandelten Organproben und klassifizierte die vorliegenden Tumore. Hierfür wurde das fixierte Organ zur Entwässerung in eine aufsteigende Alkoholreihe überführt und nach einem Xylolbad in Paraffin gebettet, dünne Schnittpräparate erstellt und diese anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Hämatoxylin färbt in Form des basischen Hämalan alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne, d.h. die DNA und das ER (Endoplasmatisches Retikulum). Eine Eosin-Färbung lässt alle eosinophilen Strukturen rot erscheinen, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst. Im Anschluss wurden die Präparate

eingedeckt und photographiert (Zeiss Axioplan; Axio Cam HRc camera; Axio-Vision Rel. 4.6 der Firma Carl Zeiss, Jena, D).

2.9 ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay)

zum Nachweis von IgG2a

Die Funktionalität von Plasmazellen sollte durch den Nachweis des Immunglobulins IgG2a in den transgenen Mausstämmen bestätigt werden.

Für die Bestimmung der IgG2a-Konzentration im Blutserum der Tiere wurde peripheres Blut nach erfolgter Hämostase für 5 min. bei 1800 rpm zentrifugiert. Die festen Blutbestandteile wurden durch den Zentrifugationsvorgang pelletiert und das überstehende Serum konnte anschließend vorsichtig abgenommen werden. Das Serum wurde bei -80°C gelagert. Für die Analyse wurde das Serum 1:100-1:1000 in PBS verdünnt eingesetzt.

Der IgG2a-Nachweis wurde nach dem Protokoll und mit Hilfe der Materialien und Puffersysteme des BD OptEIA™ mouse IgG2a ELISA Set durchgeführt.

Eine Mikrotiterplatte wurde mit Antikörpern beschichtet, die spezifisch murines Immunglobulin IgG2a binden. Mit Zugabe des Serums der unterschiedlichen Tiere werden die darin enthaltenen IgG2a-Moleküle von den beschichteten Antikörpern abgefangen. Im folgenden Schritt binden Biotin-gekoppelte Detektionsantikörper spezifisch die abgefangenen IgG2a-Moleküle. An die Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper bindet anschließend ein Streptavidin-konjugiertes Enzymreagenz. Das Enzym, Meerrettichperoxidase (HRP; engl.: *horseradish peroxidase*), reagiert mit einem chromogenen Substrat (Wasserstoffperoxid und TMB, Tetrametyhylbenzidin) und es erfolgt eine blaue Farbreaktion. Diese Farbreaktion wird durch die Zugabe von Phosphor- oder Schwefelsäure gestoppt und erfährt dadurch einen Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Farbreaktion ist direkt proportional zur Konzentration des Antigens. Bei einer Wellenlänge von 450 nm kann nun die Absorbtion der Proben gemessen werden. Um verfälschte Messwerte durch die Absorbtion des Substrates zu umgehen, erfolgt zusätzlich eine Analyse der Proben bei 570 nm. Mit Hilfe der Subtraktion dieses Korrekturwertes und der Berechnung einer Standardkurve (aus standardisierten Antigenkonzentrationen: Standardkonzentrationen von 200 ng/ml

– 3,1 ng/ml in sieben Schritten) wurde die exakte Konzentration des Antigens ermittelt.

2.10 Konfokalmikroskopie (*Laser scanning microscopy*)

Bei CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tieren wurde ein Teil der Milz in O.C.T. compound eingebettet. Das Organ wurde dazu nach der Entnahme in das visköse Einbettmedium überführt, direkt mittels flüssigen Stickstoffs gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Um das SmoM2-YFP-Fusionsprotein in Milzzellen durch konfokale Lasermikroskopie zu detektieren wurden die Proben von der Arbeitsgruppe für Gastrointestinale Immunologie (Prof. Dr. Elke Cario) des Instituts für Gastroenterologie am Universitätsklinikum Essen bearbeitet. Hierfür wurden die gefrorenen Organe an einem Kryotom in 7 µm dünne Scheiben geschnitten. Die Kryotomschnitte wurden anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut, getrocknet und per ImmEdge™Pen hydrophob umrandet. Darauf folgte eine Fixierung der Schnitte in 4% PFA (Paraformaldehyd). Das SmoM2-YFP-Protein wurde mit einem anti-GFP-Antikörper (ab290; Abcam), der das YFP des Fusionsproteins erkennt, detektiert. Für die Fluoreszenzdetektion wurde ein spezifischer Fluorochrom (Alexa Fluor488)-gekoppelter Zweitantikörper gegen den anti-GFP-Antikörper verwendet. Das gefärbte Präparat wurde mit VECTASHIELD *Mounting Medium* (mit DAPI) unter einem Deckglas luftdicht verschlossen.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie kann von einer einzigen Ebene des gefärbten Kryoschnittes reflektiertes oder emittiertes Licht erfasst werden. Im Gegensatz zur ursprünglichen Fluoreszenzmikroskopie wird hier das Präparat nicht von einem Lichtstrahl vollständig beleuchtet, sondern nur von einem gebündelten Laserstrahl zeilenweise abgetastet. Diese zeilenweise generierten Daten werden zu einem Bild zusammengesetzt. Die Fluoreszenz wird daher immer nur an einem Punkt angeregt und die Entstehung von Streulicht in den umliegenden Bereichen minimiert.

Der Laserstrahl regt auf einem Punkt des Präparates das Antikörper-gekoppelte Fluorochrom an. Das emittierte Licht aus der Fokusebene des Präparates wird durch dichroitische Filter reflektiert und durch eine Lochblende (engl.: *pinhole*) an einen Detektor weitergegeben. Bei allen Konfokalmikroskopen befindet sich die

Lochblende vor dem Detektor in der hinteren Brennebene. Die Lochblende sorgt dafür, dass Licht, das nicht aus der Fokusebene stammt, vom Detektor nicht erfasst wird. Durch die Reduktion von Streulicht wird eine sehr gute Auflösung in allen optischen Ebenen (X,Y,Z) erreicht. Dies ermöglicht die Durchführung von optischen Schnitten durch das Präparat sowie eine dreidimensionale Rekonstruktion des Objektes.

Die präparierten Milzschnitte wurden am Zeiss LSM 510-Axiovert 100 M gemessen und mittels Zeiss LSM Image Browser Software analysiert.

2.11 Statistik

Alle statistischen Daten sind als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Alle Signifikanzniveaus (Ausnahmen sind gekennzeichnet) wurden mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests mit ungleicher Varianz (heteroskedastisch) ermittelt. Von einem signifikanten Unterschied wurde bei einem errechneten Wert von $p < 0,05$ gesprochen.

3. Ergebnisse

3.1 Genotypisierung transgener Mäuse

Der Smo-Rezeptor wurde zell- bzw. gewebespezifisch inaktiviert oder konstitutiv aktiviert, um den Einfluss des Hh-Signalweges auf die Hämatopoese zu untersuchen.

Die Methode der Cre-vermittelten Rekombination von loxP-flankierten Sequenzen gewährleistete die Manipulation des Hh-Signalweges in den gewünschten Zielzellen. Die Cre-Rekombinase schneidet „gefloxt“ Sequenzen in Zellpopulationen, in denen die regulatorischen Sequenzen des transgenen Cre-Konstruktes aktiv sind. Diese loxP-flankierten Sequenzen waren zum einen das Exon 1 des Smo-Gens (Smo^{loxP}) und zum anderen die STOP-Kassette vor der Sequenz des SmoM2-Rezeptors ($\text{R26}^{\text{SmoM2}}$). Diese mutierte Form des Smo-Proteins ist unabhängig von inhibierenden Komponenten des Signalweges. Mit der Verwendung unterschiedlicher Cre-Rekombinasen sollte die Deletion oder die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges erreicht werden.

Das HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgen (kurz: SCL-Cre-ER^T) ist in hämatopoetischen Stammzellen aktiv. Die Cre-ER^T-Rekombinase ist ein Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und einer mutierten Liganden-bindenden Domäne des murinen Östrogenrezeptors. Die Applikation von Tamoxifen bewirkt die Translokation des Cre-ER^T-Fusionsproteins aus dem Zytoplasma in den Zellkern, um dort die loxP-flankierte Sequenz zu rekombinieren. Die Cre-ER^T-Rekombinase wurde zur zeitlich kontrollierten Induktion der Cre-Rekombination verwendet. Ein konstitutiv aktives Cre-Transgen, das schon in den frühen hämatopoetischen Stammzellen und in allen reifen hämatopoetischen Zellen aktiv ist, ist das Vav-iCre-Transgen. Spezifisch für die Rekombination von konditionalen loxP-Allelen in B-Lymphozyten wurde ein CD19-Cre-*knockin*-Allel verwendet. Für die Cre-vermittelte Rekombination im Thymusepithel wurde das Foxn1-Cre-Transgen eingesetzt.

Um Mäuse zu generieren, die die Manipulation des Hh-Signalweges erlaubten, mussten unterschiedliche transgene Mausstämme verkreuzt werden. Dabei erfolgt die Weitergabe der Cre-Transgene sowie der konditionalen Allele theoretisch entsprechend der Mendel'schen Regeln.

Die Verkreuzungsstrategie zur Generierung eines Hämatopoese-spezifischen *Smo*-knockout ($\text{Cre};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ -Mäuse) *in vivo* wird im Folgenden dargestellt. Zunächst wurden für das konditionale *Smo*-Allel heterozygote Mäuse ($\text{Smo}^{\text{loxP/wt}}$ -Tiere) miteinander verpaart. Daraus resultierten, den Mendel'schen Regeln entsprechend, neben anderen Konstellationen in 25 % der Nachkommen, Tiere, die für das konditionale *Smo*-Allel homozygot waren ($\text{Smo}^{\text{loxP/loxP}}$ -Tiere). In einer parallel angesetzten Verpaarung wurden Cre-transgene Mäuse mit heterozygoten konstitutiven *Smo*-knockout Mäusen ($\text{Smo}^{\text{Null/wt}}$ -Tiere) verpaart. Damit bereits die Rekombination eines Smo^{loxP} -Allels ausreicht, um einen vollständigen *Smo*-knockout zu erhalten, wurde das Smo^{Null} -Allel verwendet. Aus der Verkreuzung der Cre-transgenen Maus mit der heterozygoten $\text{Smo}^{\text{Null/wt}}$ -Maus resultierten ebenfalls zu 25 % Mäuse, die Cre-transgen und heterozygot für das Smo^{Null} -Allel waren ($\text{Cre};\text{Smo}^{\text{Null/wt}}$ -Tiere). Diese $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{Null/wt}}$ -Mäuse wurden weiter mit $\text{Smo}^{\text{loxP/loxP}}$ -Mäusen verkreuzt. Aus der Verpaarung entstanden die experimentellen $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ und die Kontrolltiere mit einem $\text{wt};\text{Smo}^{\text{loxP/wt}}$ -, $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{loxP/wt}}$ - und einem $\text{wt};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ -Genotyp (Abb.3.1).

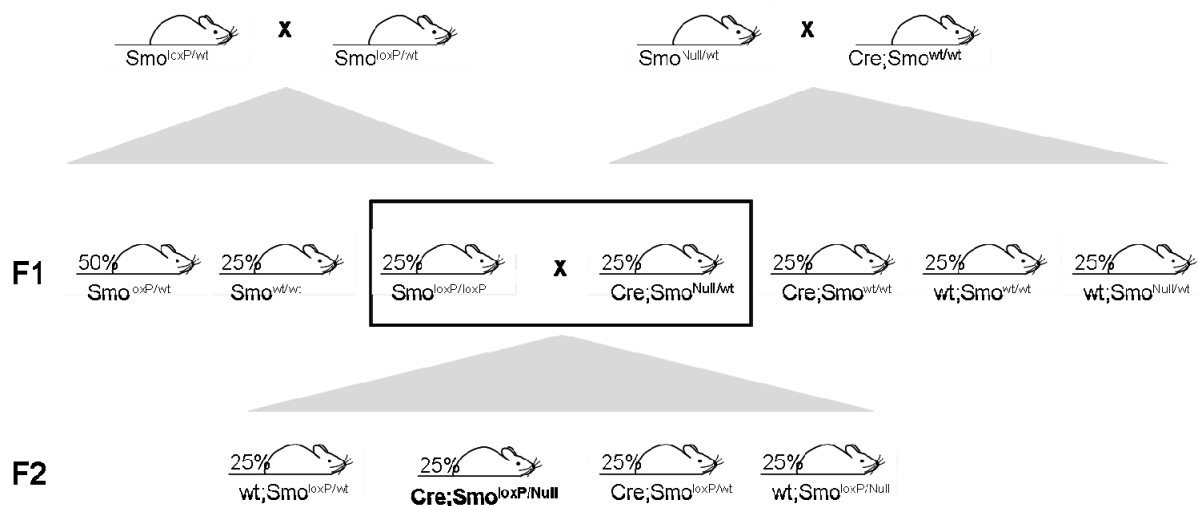


Abb.3.1: Beispiel eines Kreuzungsschemas für die Generierung von *Smo*-knockout-Tieren.

Die Vorverkreuzungen führten zu Nachkommen (25 % des Wurfes) mit einem $\text{Smo}^{\text{loxP/loxP}}$ - oder $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{Null/wt}}$ -Genotyp. Die Verpaarung der $\text{Smo}^{\text{loxP/loxP}}$ - und $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{Null/wt}}$ -Tiere ergab ebenfalls zu 25 % Nachkommen mit dem gewünschten experimentellen $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ -Genotyp.

Die Generierung von Mäusen mit drei Transgenen (Cre;Smo^{loxP/Null}-Genotyp) erforderte einen Zeitaufwand, inklusive der entsprechenden Vorverpaarungen, von mindestens fünf Monaten.

3.1.1 Genotypisierung der Tiere mit einem Hämatopoese-spezifischen Smo-knockout

Um den Genotyp der individuellen Mäuse zu prüfen, wurden spezifische PCR-Nachweise zur Detektion der Smo-knockin-Allele und der Cre-Sequenzen angewendet. Bei den Tieren, die für die Deletion des Smo-Rezeptors in unterschiedlichen Zellen und Geweben gezüchtet wurden, wurden das Smo^{loxP}-Allel sowie das Smo^{Null}-Allel folgendermaßen nachgewiesen (Abb.3.2):

Um das Smo^{wt}-Allel zu detektieren, wurde ein 5' (engl.: *forward*)-Primer (#204) entworfen, der vor dem Exon 1 in der *non coding sequence* (NCS, dt. nicht kodierende Sequenz) des Smo-Gens hybridisiert. Als 3' (engl.: *reverse*)-Primer (#110) wurde ein Oligonukleotid aus dem Intron 1 abgeleitet. Das resultierende PCR-Produkt hat eine Länge von 862 bp. Die Nummerierung der Primer entspricht den Angaben der Arbeitsgruppen-internen Datenbank.

Das Smo^{Null}-Allel enthält eine PGK-NEO^R-Kassette, die mit einem spezifischen *forward*-Primer (#109) und dem *reverse*-Primer (#110) des Smo-Intron 1 detektiert wurde (Produktgröße: 344 bp).

Für den Nachweis des Smo^{loxP}-Allels wurde ein *forward*-Primer (#210), der ebenfalls im Bereich der NEO^R-Kassette anlagert, gewählt. Dieser Primer kombiniert mit einem *reverse*-Primer (#205), der die *downstream* der 3' loxP-Stelle liegenden Taurin-β-Galaktosidase (kurz: Tau-LacZ)-Sequenz des Transgens bindet, amplifiziert ein Produkt des undeletierten Allels von ~1.1 kb. Die Tau-LacZ-Sequenz ist Teil des verwendeten Vektors und für die vorliegende Arbeit nicht weiter relevant (Long et al., 2001).

Chromosom 6

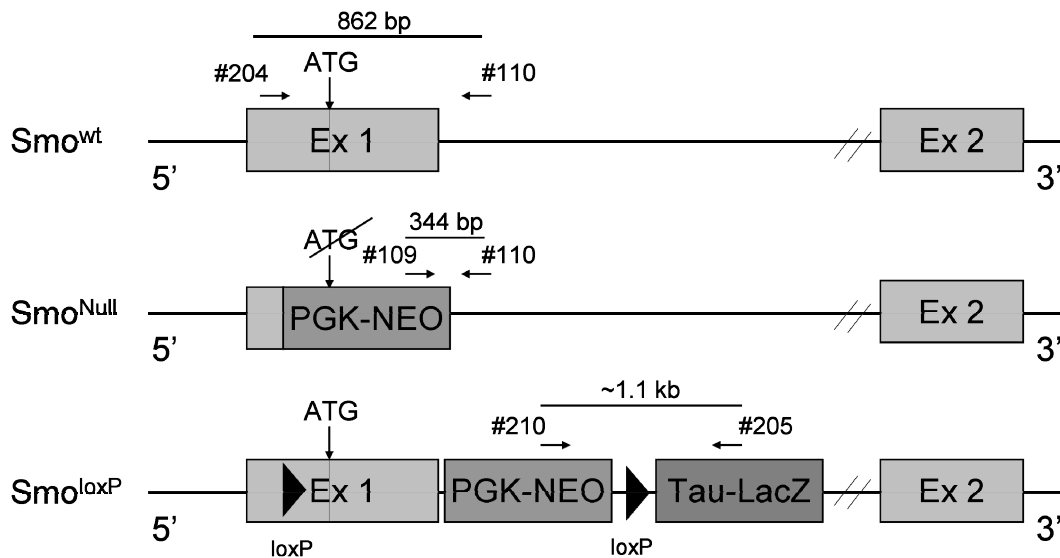


Abb.3.2: Schematische Darstellung der verwendeten Smo-Loki. In die unterschiedlichen Loki sind die Primer (schwarze Pfeile), die für den PCR-Nachweis verwendet wurden, eingezeichnet. PGK, engl.: *phosphoglycerine kinase*; NEO, NEO^R-Kassette; Ex, Exon; Int, Intron; Tau, Taurin; LacZ, β -Galaktosidase; NCS, engl.: *non coding sequence*; #109 NEO_PolyA_fw; #110, Intron_1_rev; #210, NEO3_fwd; #205, MAPT1_rev; #204, SmoNCS3_fwd.

Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft die Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten der Genotyp-Analyse von Nachkommen einer Verpaarung von *Smo*^{loxP/loxP}- und *Cre*;*Smo*^{Null/wt}-Mäusen. Wie erwartet trugen alle Tiere das *Smo*^{loxP}-Allel, während das *Smo*^{Null}- und das *Smo*^{wt}-Allel in 50% der Fälle weitergegeben wurden. In diesem Beispiel wiesen drei der Nachkommen zu dem *Smo*^{loxP}-Allel ebenfalls das PCR-Produkt für das *Smo*^{wt}-Allel auf (*Smo*^{loxP/wt}-Mäuse). Für die anderen drei Tiere konnte keine Amplifikation des *Smo*^{wt}-Allels gezeigt werden, jedoch ein spezifisches PCR-Produkt für das *Smo*^{Null}-Allel (*Smo*^{loxP/Null}-Mäuse). Zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA wurde in allen PCR-Experimenten zusätzlich eine genomische Sequenz aus dem SCL-Lokus amplifiziert (aus der Datenbank von NCBI: SCL-Lokus AJ131017; Produktgröße 722 bp).

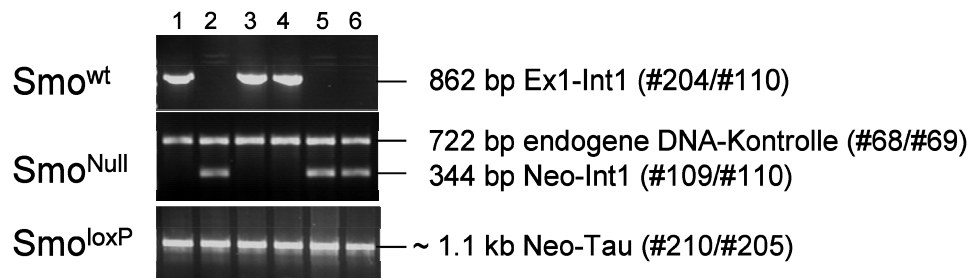


Abb.3.3: Nachweis der unterschiedlichen Smo-Allele durch PCR-Analyse. In diesem Beispiel wurden die sechs Nachkommen einer Verpaarung einer $\text{Smo}^{\text{loxP/loxP}}$ - und $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{Null/wt}}$ -Maus genotypisiert. Alle Tiere besaßen ein Smo^{loxP} -Allel (~1.1 kb; Primer #210 und #205). Die Mäuse 2, 5 und 6 wiesen zudem das Smo^{Null} - (344 bp; Primer #109 und #110) Allel auf. Maus 1, 3 und 4 tragen das Smo^{wt} -Allel (862 bp; Primer #204 und #110). Die endogene DNA-Kontrolle (722 bp) des Smo^{Null} -Nachweises stellt das Amplifikationsprodukt einer SCL-Gensequenz dar (Primer #68 und #69). PGK, engl.: *phosphoglycerine kinase*; NEO, Neomycin; Ex, Exon; Int, Intron; Tau, Taurin.

Alle bisher erhobenen Daten sprechen dafür, dass das Smo^{loxP} -Allel in Abwesenheit einer Cre-Rekombinase funktionell dem Smo^{wt} -Allel entspricht (Long et al., 2001). Um das genetische Modell zu komplettieren, wurde die zell- bzw. gewebespezifische Cre-Rekombinase, die den loxP-flankierten Bereich der Zielsequenz deletiert, als zusätzliches Transgen eingekreuzt.

Für den Nachweis der unterschiedlichen Cre-Transgene wurden Primer verwendet, die die Sequenz der Cre-Rekombinase binden [#1 und #2; (Emambokus und Frampton, 2003)]. Für die Detektion des Transgens der Vav-iCre-Rekombinase wurde ein Nachweis mit Vav-iCre-spezifischen Primerkombination (#186 - #189) verwendet (Abb.3.4).



Abb.3.4: Nachweis der Vav-iCre- und Cre-Rekombinase-Sequenz durch PCR-Analyse. In diesem Beispiel wurden zwölf Tiere, sechs Tiere pro Wurf, in Bezug auf die Anwesenheit einer Vav-iCre- (485 bp; Primer #186 und #187) oder Cre-Sequenz (~ 500 bp, Primer #1 und #2) getestet. Maus 2 und 6 wiesen das Vav-iCre-Transgen auf. Maus 7, 8, 10 und 12 zeigten die Amplifikation eines Cre-Transgens. Die interne DNA-Kontrolle für den Vav-iCre-Nachweis stellt die Amplifikation einer genomischen Sequenz aus dem Fas-Lokus dar (~400bp, Primer #188 und

#189). Die Qualität der DNA wurde für die Cre-PCR-Analyse durch die Amplifikation einer SCL-Sequenz (722 bp; Primer #68 und #69) geprüft.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Nachweise zur Genotypisierung der Tiere, die einen Hämatopoese-spezifischen *Smo-knockout* aufwiesen, sind spezifisch für die transgenen Sequenzen entworfen oder aus publizierten Arbeiten und von anderen Arbeitsgruppen (siehe Kap.7, Tab.7.2) übernommen worden. Die korrekte Amplifikation konnte durch eine Sequenzierung der PCR-Produkte validiert werden.

3.1.2 Genotypisierung der SmoM2-transgenen Mäuse

Die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges in den unterschiedlichen Zellkompartimenten setzte ein SmoM2-Transgen im Genom der experimentellen Tiere voraus. Um den Genotyp der individuellen R26^{SmoM2}-Mäuse zu prüfen, wurden spezifische PCR-Nachweise zur Detektion des R26-*knockin*-Allels verwendet (Abb.3.5) (Soriano, 1999). Die mRNA-Expression des R26^{SmoM2}-Allels wird nach der Deletion der STOP-Kassette durch die Cre-Rekombinase zellreihenspezifisch aktiviert und führt anschließend zur Translation des SmoM2-Rezeptors. Die PCR-Analysen der Cre-transgenen Sequenzen wurden, wie unter Kap.3.1.1 beschrieben, durchgeführt.

Die Amplifikation des R26^{wt}-Allels erfolgte durch einen *forward*-Primer (#12), der in der R26^{wt}-Sequenz hybridisiert und einem *reverse*-Primer (#14), der ~500 bp *downstream* in der Wildtyp-Sequenz anlagert. Die Detektion des R26^{SmoM2}-Allels erfolgte mit dem genannten *forward*-Primer #12, der in der R26^{wt}-Sequenz vor der *knockin*-Sequenz hybridisiert und einen *reverse*-Primer, der spezifisch die Sequenz des R26-*knockin*-Konstruktes detektiert. Die Produktgröße betrug ~250 bp (Abb.3.5).

Durch die hier verwendeten validierten PCR-Analysen konnte die Präsenz des genetisch veränderten R26-Allels erfolgreich nachgewiesen werden.

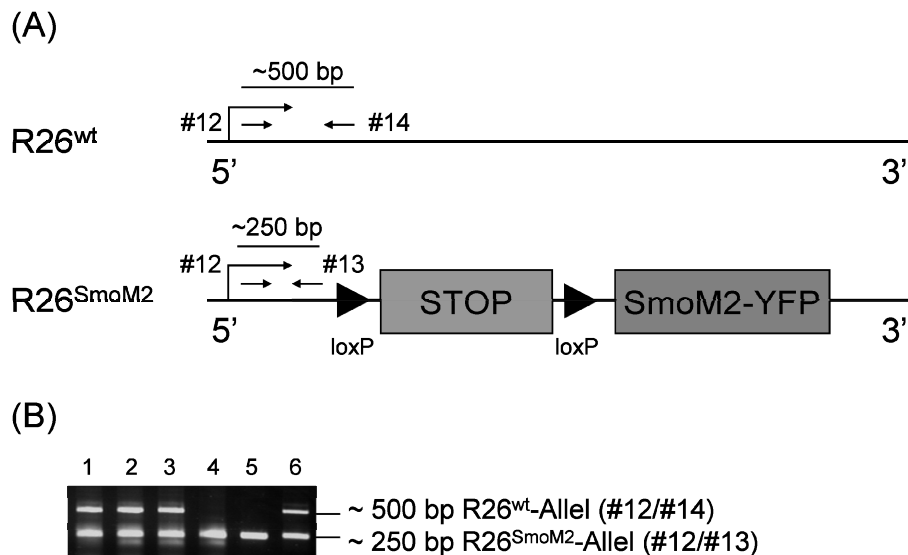


Abb.3.5: Nachweis des R26^{SmoM2}-Allels durch PCR-Analyse. (A) Schematische Darstellung des R26^{wt}- und R26^{SmoM2}-Allels und den verwendeten Primern (schwarze Pfeile; #12, #13, #14) für den spezifischen PCR-Nachweis. (B) Die Abbildung zeigt Amplifikationsprodukte der Nachkommen einer Verkreuzung, in der beide Elterntiere heterozygot für das manipulierte R26-Allel (~250 bp) waren. In der F1-Generation fanden sich in diesem Beispiel vier heterozygote (1, 2, 3 und 6) und zwei homozygote Tiere (4 und 5) für das R26-*knockin* wieder. Kontrolle, R26^{wt}-Allel (~500 bp).

3.2 Nachweis der rekombinierten transgenen Sequenzen

Die konditionale Deletion des Exon 1 des Smo-Rezeptors und die Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels, die zur Expression des konstitutiv aktiven SmoM2-Proteins führte, wurde unter Verwendung von gDNA desjenigen Gewebes oder derjenigen Zellpopulation nachgewiesen, in dem oder der die Cre-Expression zur Rekombination führte.

Der definitive Nachweis, dass die angestrebte Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hatte, wurde ebenfalls durch unterschiedliche PCR-Strategien erbracht.

3.2.1 Nachweis der rekombinierten Smo-Allele

Die Cre-vermittelte Rekombination des Smo^{loxP}-Allels ist Voraussetzung für den Hämatopoese-spezifischen Smo-*knockout*. Um die Rekombination des Smo^{loxP}-Allels zu prüfen, wurde eine spezifische PCR-Strategie entwickelt, die es

ermöglichte das intakte und das rekombinierte Smo^{loxP} -Allel in einer PCR-Analyse nachzuweisen.

Die $\text{Cre};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ -Mäuse trugen neben einem Smo^{Null} -Allel auf dem zweiten Smo -Allel die loxP-flankierte Sequenz des Smo -Exon 1, die nach der Expression der Cre-Rekombinase deletiert wurde. Ein intaktes Smo^{loxP} -Allel wurde, wie unter Kap.3.1.1 beschrieben, nachgewiesen. Die Rekombination des Smo^{loxP} -Allels wurde über einen *forward*-Primer (#204), der für die Sequenz der NCS des Smo -Exon 1 spezifisch ist und einen *reverse*-Primer (#205), der an der Tau-LacZ-Sequenz ansetzt (Abb.3.6), nachgewiesen. Die erwartete Größe des korrekten PCR-Produktes betrug in etwa 700 bp.

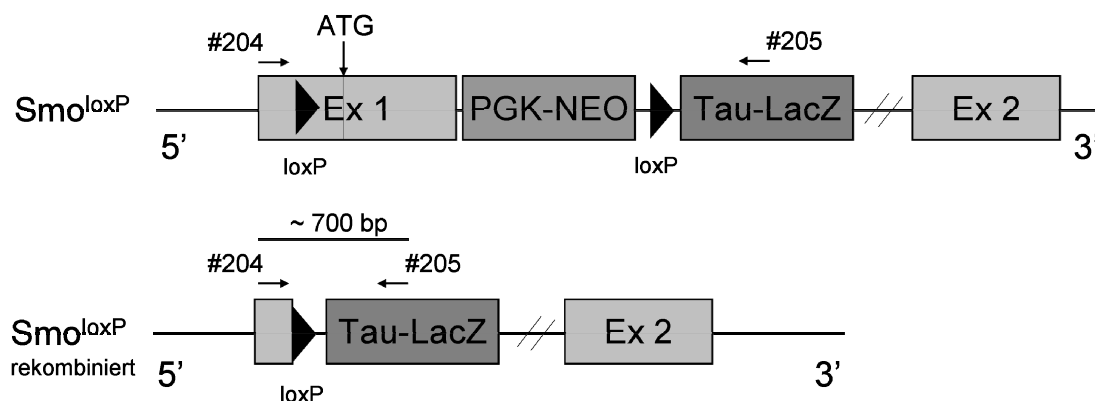


Abb.3.6: Schematische Darstellung des rekombinierten Smo^{loxP} -Allels vor und nach erfolgter Rekombination. Die Primer #204 und #205, die für den Nachweis des deletierten Smo -Exon 1 abgeleitet wurden, sind als schwarze Pfeile gekennzeichnet. Tau, Taurin; LacZ, β -Galaktosidase.

Hämatopoetische Stammzellen-spezifisches Smo -knockout mit Hilfe des HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgens

In den $\text{SCL-Cre-ER}^{\text{T}};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ -Mäusen wurde das Exon 1 des Smo -Gens spezifisch in den hämatopoetischen Stammzellen deletiert, sobald die nukleäre Translokation der Cre-Rekombinase durch die Applikation von Tamoxifen induziert wurde. Um die erfolgreiche Rekombination des Smo^{loxP} -Allels durch das HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgen zu untersuchen, wurde die beschriebene spezifische PCR-Analyse verwendet (Abb.3.6). Die gDNA wurde aus Knochenmarkzellen (KM) der *Femora* und der *Tibiae* der Tiere isoliert (Kap.2.2.1). In Abhängigkeit von

der Dauer der TAM-Induktion war bei den experimentellen und bei den Kontrolltieren ein intaktes Smo^{loxP} -Allel zu erkennen. Aus der gDNA von Tieren, die zwei Wochen lang mit TAM behandelt worden waren, konnte ein PCR-Produkt des nicht-rekombinierten Smo -Allels amplifiziert werden. Die gDNA im Knochenmark der Tiere, welche über einen Zeitraum von 10 Wochen TAM-angereichertes Futter erhielten, wies neben der Bande des rekombinierten Allels eine schwache Bande des nicht-rekombinierten Allels auf (Abb.3.8). Ab dem Zeitpunkt der Induktion der Cre-vermittelten Rekombination waren die HSC genetisch manipuliert. Im Laufe der Zeit sollten diese HSC zu dem Erhalt des blutbildenden Systems beitragen. Der Nachweis des nicht-rekombinierten Allels ist auf die gDNA der reifen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark zurückzuführen, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht von Smo -defizienten HSC abstammten. Dementsprechend stieg im Laufe der Zeit der Anteil an Zellen, die von Smo -defizienten HSC stammen im Knochenmark an. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass sich Smo -rekombinierte HSC in normalem Maße an der Hämatopoese beteiligen.

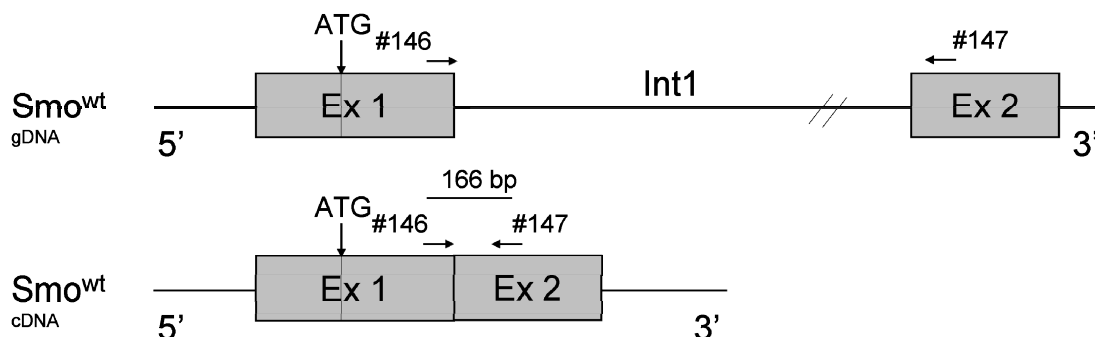


Abb.3.7: Schematische Darstellung des Smo^{wt} -Lokus und der verwendeten Primer zur Detektion des Smo -Exon 1 und 2 mittels PCR-Analyse. Die Primer #146 und #147 lagern spezifisch an Smo -Exon 1 und 2. Ex, Exon; Int, Intron.

Die Deletion des Exon 1 konnte ebenfalls auf RNA-Ebene mittels RT (Reverse Transkriptase)-PCR (cDNA der Knochenmarkszellen) nachgewiesen werden. Hierfür wurden Primer verwendet, die in Exon 1 (#146) und Exon 2 (#147) des Smo -Gens binden (Abb.3.7; Produktgröße: 166 bp). Die fehlende Amplifikation einer cDNA, die Exon 1 enthält, ist ein weiterer Nachweis für die erfolgreiche Deletion des Smo -Exon 1 auf DNA-Ebene.

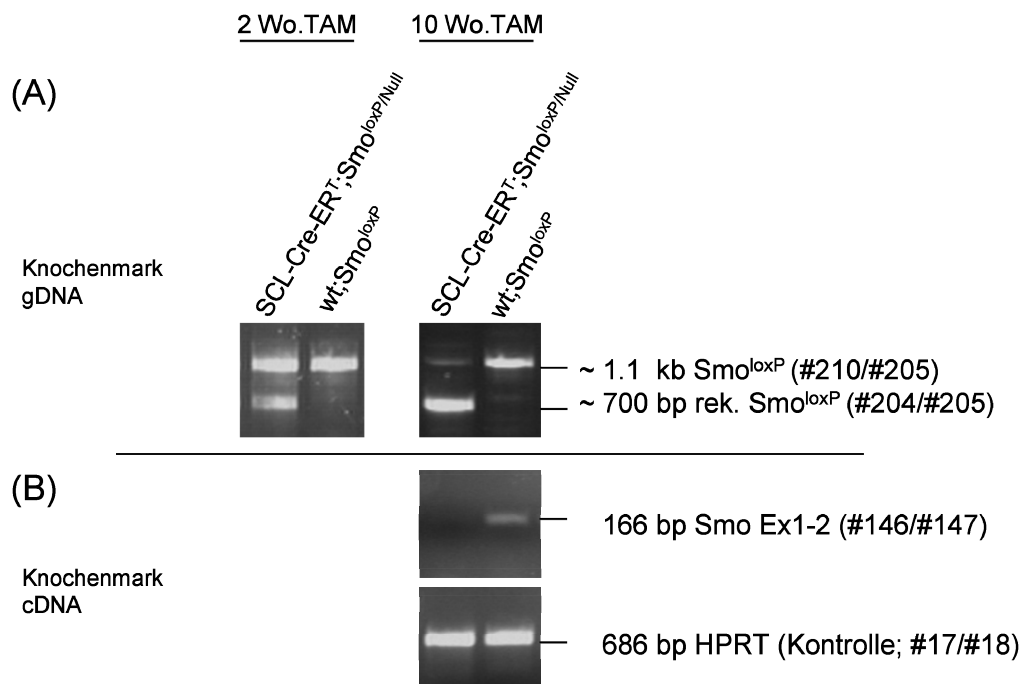


Abb.3.8: Rekombinationsnachweis des *Smo*^{loxP}-Allels durch PCR-Analyse auf genomischer DNA- und mRNA-Ebene. Im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T; *Smo*^{loxP/Null}-Tiere konnte das (A) intakte (~1.1 kb; Primer #210 und #205) und das deletierte (~700 bp; Primer #204 und #205) *Smo*^{loxP}-Allel nachgewiesen werden. Tiere, die über einen Zeitraum von 10 Wochen mit TAM-Futter induziert und eine Woche später im Alter von 4 Monaten zur Analyse präpariert wurden, wiesen im Gegensatz zu Tieren, die nur 2 Wochen behandelt und fünf Wochen später im Alter von 7 Monaten präpariert wurden, nur eine minimale Bande des nicht-rekombinierten *Smo*^{loxP}-Allels auf. (B) PCR-Analysen der cDNA des Knochenmarks zeigten den Verlust des *Smo*-Exon 1 (166 bp, Primer #146 und #147). Als Kontrolle wurde die Amplifikation von Sequenzen eines *house keeping*-Gens (HPRT-Gen; 686 bp; Primer #17 und #18) durchgeführt. Ex, Exon; del., deletiertes bzw. rekombiniertes Allel; Wo., Wochen; TAM, Tamoxifen.

Die spezifischen PCR-Analysen zum Nachweis der HSC-SCL-Cre-ER^T-vermittelten Rekombination zeigten im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T; *Smo*^{loxP/Null}-Tiere den Verlust des *Smo*-Exon 1. Diese Ergebnisse weisen einen effektiven TAM-induzierten HSC-spezifischen *Smo*-knockout nach.

Hämatopoese-spezifisches Smo-knockout mit Hilfe des Vav-iCre-Transgens

Die spezifische Expression der Vav-iCre-Rekombinase in allen hämatopoetischen Zellen führte zur Rekombination des Smo^{loxP}-Allels und somit zu einem hämatopoetischen Smo-knockout. Um die erfolgreiche iCre-vermittelte Rekombination nachzuweisen, wurden für die PCR-Analyse des rekombinierten Smo^{loxP}-Allels dieselbe Primerkombination, wie oben beschrieben, für die Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse angewendet. Aus der gDNA des präparierten Knochenmarks der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere konnte ausschließlich das rekombinierte Smo^{loxP}-Allel nachgewiesen werden (Abb.3.9A). In Thymus und Milz der Tiere konnte ebenfalls eine erfolgreiche Deletion des Smo-Exon 1 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Der fehlende PCR-Nachweis des nicht-rekombinierten Smo^{loxP}-Allels spricht für eine nahezu 100 % ige Rekombinationseffizienz des Vav-iCre-Transgens. Die Transkription einer Smo-Exon 1 enthaltenen mRNA konnte dementsprechend in den experimentellen Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäusen nicht nachgewiesen werden (Abb.3.9B).

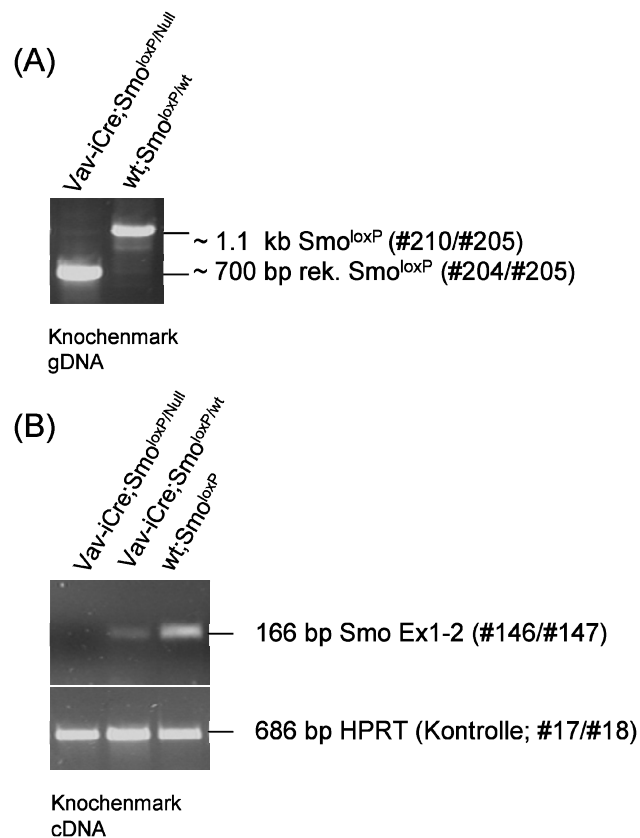


Abb.3.9: Rekombinationsnachweis des Smo^{loxP}-Allels durch PCR-Analyse auf genomischer DNA- und mRNA-Ebene. Im Knochenmark der Vav-iCre;Smo^{loxP}/Null-Tiere konnte das (A) rekombinierte Smo^{loxP}-Allel (~700 bp; Primer #204 und #205) und das intakte Smo^{loxP}-Allel (~1.1 kb; Primer #210 und #205) der Kontrolltiere nachgewiesen werden. (B) PCR-Produkte der cDNA-Amplifikation (Knochenmark) von Smo-Exon 1 bis 2 (166 bp; Primer #146 und #147) eines Vav-iCre;Smo^{loxP}/Null-Tieres, einer heterozygoten und einer Wildtyp-Maus. Die Tiere wurden in einem Alter von 2-6 Monaten analysiert. Als Kontrolle wurde die Amplifikation von Sequenzen eines *house keeping*-Gens (HPRT-Gen; 686 bp; Primer #17 und #18) durchgeführt. Ex, Exon.

Um die Transkription des Smo-Gens *downstream* des deletierten Exon 1 zu prüfen, wurde des Weiteren mittels RT-PCR-Analysen die Expression des Smo-Exon 11-12 untersucht. Hierfür wurden Primer (#39, #40) verwendet, die in Exon 11 und 12 des Smo-Gens binden. Aus der cDNA des Knochenmarks der Vav-iCre;Smo^{loxP}/Null-Tiere und der Kontrolltiere konnte gleichermaßen das amplifizierte PCR-Produkt des Smo-Exon 11-12 detektiert werden (Abb.3.10).

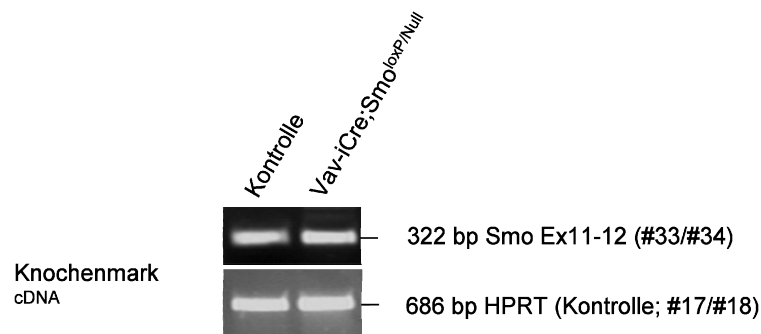


Abb.3.10: RT-PCR-Analyse des Smo-Exon 11-12. RT-PCR-Nachweis des Smo-Exon 11-12 aus der cDNA von Knochenmarkszellen der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere (n=3) und Kontrolltiere (n=3). Die Tiere wurden in einem Alter von 5 Monaten analysiert. Es wurden die Primer #33 und #34 verwendet (siehe Kap.7, Tab.7.4). Als Kontrolle wurde die Amplifikation von Sequenzen eines *house keeping*-Gens (HPRT-Gen; 686 bp; Primer #17 und #18) durchgeführt. Ex, Exon.

Der Nachweis einer Smo-mRNA in den Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tieren, die die Smo-Exone 11 und 12 beinhaltet, spricht für die Transkription einer Smo-mRNA ohne das für die Funktion essentielle Exon 1.

Die Ergebnisse der spezifischen PCR-Analysen zeigten, dass die Vav-iCre-vermittelte Rekombination und somit der Smo-*knockout* in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere erfolgreich und sehr effizient, zu nahezu 100%, war.

Smo-knockout innerhalb der B-Zellpopulation mit Hilfe des CD19-Cre-knockin-Allels

In den frühen und reifen B-Zellen der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere wurde die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD19-Promotors exprimiert. Die Deletion des Smo-Exon 1 war in diesem System auf die Population der B-Lymphozyten beschränkt. Für die PCR-Analyse der Deletion des Exon 1 konnten der *forward*-Primer (#204) in der NCS des Smo-Exon 1 und der *reverse*-Primer (#205) in der Tau-LacZ-Sequenz des Vektors verwendet werden (Abb.3.6). In die Analyse wurde gDNA des Knochenmarks der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}- und der Kontrolltiere eingesetzt. Die Rekombination des Smo^{loxP}-Allels sowie das nicht-rekombinierte Allel konnten aus der gDNA der experimentellen CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere nachgewiesen werden (Abb.3.11). Die Wildtyp-Kontrolltiere trugen kein Smo^{loxP}-

Allel. Die Amplifikation des Wildtyp-Smo-Allels der Kontrolltiere diente der zusätzlichen Bestätigung des Genotyps. Hierfür wurden Primer verwendet, die im Exon 1 und Intron 1 des Smo-Gens binden (Primer #204 und #110; Produktgröße: 862 bp; Abb.3.2). Die Amplifikation eines nicht-rekombinierten Smo^{loxP}-Allels im Knochenmark der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere ist auf gDNA hämatopoetischer Zellen zurückzuführen, die nicht der B-Zellreihe angehören.

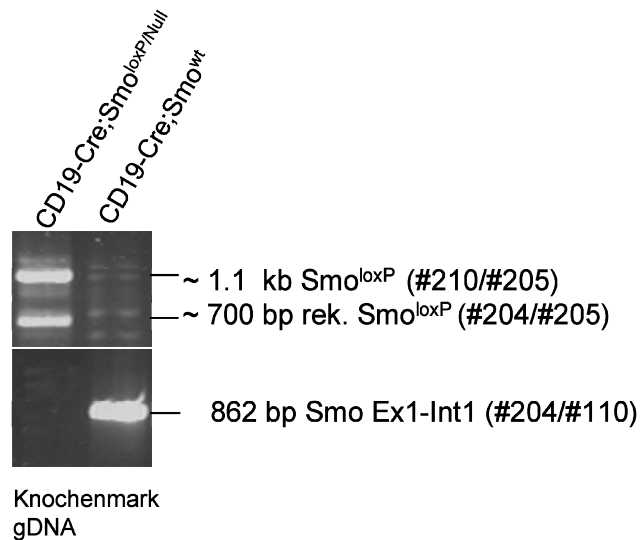


Abb.3.11: Rekombinationsnachweis des Smo^{loxP}-Allels durch PCR-Analyse. Im Knochenmark der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere konnten das rekombinierte Smo^{loxP}-Allel (~700 bp; Primer #204 und #205) und das intakte Allel (~1.1 kb; Primer #210 und #205) nachgewiesen werden. Die Kontrolle wies kein Smo^{loxP}-Allel auf, jedoch das Wildtyp-Allel (862 bp; Primer #204 und #110) des Smo-Gens. Die Tiere wurden in einem Alter von 4-5 Monaten analysiert. Ex1-Int1, Exon 1 bis Intron 1 des Wildtyp-Allels; del., deletiertes bzw. rekombiniertes Allel.

Als Kontrolltiere wurden in diesem Fall CD19-Cre;Smo^{wt}-Tiere verwendet, da das *knockin*-Konstrukt der Cre-Rekombinase im CD19-Lokus die Expression des CD19-Proteins verhindert. Der Verlust eines funktionellen CD19-Allels konnte durch den Expressionsunterschied des CD19-Proteins auf der Oberfläche von B220⁺ B-Zellen von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu heterozygoten CD19-Cre-Tieren durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Abb.3.12).

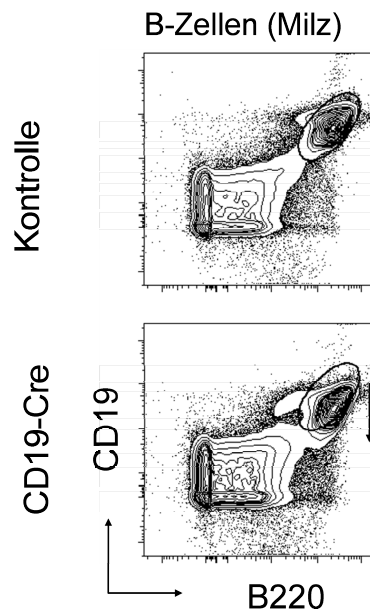


Abb.3.12: Kontur-Plot (FlowJo-Programm)-Darstellung des CD19-Markers auf den B-Zellen der Milz von CD19-Cre-*knockin*-Mäusen und Kontrolltieren. Die Tiere, die die CD19-Cre-Rekombinase aufwiesen, zeigten eine niedrigere CD19-Expression auf der Oberfläche der B220⁺ B-Zellen.

Um unbekannte Effekte einer CD19-Heterozygotie auszuschließen, wurden für die folgenden Analysen (Kap.3.3.4 und 3.4.4) CD19-Cre-Tiere als Kontrollen verwendet.

Die spezifischen PCR-Analysen zum Nachweis der CD19-Cre-vermittelten Rekombination zeigten im Knochenmark der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere den Verlust von Teilsequenzen des Smo-Exon 1. Dies spricht für die erfolgreiche Deletion des Smo-Exon 1 in B-Lymphozyten.

Smo-knockout innerhalb des Thymusepithels mit Hilfe des Foxn1-Cre-knockin-Allels

Um die Foxn1-Cre-vermittelte Rekombination nachzuweisen, die spezifisch im Thymusepithel der Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse zur Deletion des Smo-Exon 1 führte, wurde erneut das beschriebene PCR-Verfahren (Abb.3.6) verwendet. Aus der gDNA des isolierten Thymusstromas konnte das nicht-rekombinierte sowie das rekombinierte Smo^{loxP}-Allel nachgewiesen werden (Abb.3.13). Das spezifische PCR-Produkt des rekombinierten Smo^{loxP}-Allels erscheint als schwache Bande, da die Epithelzellen des Thymus nur eine Subpopulation des Thymusstromas

darstellen. Die vergleichsweise starke Amplifikation des nicht-rekombinierten Smo^{loxP} -Allels resultiert demnach wahrscheinlich aus der gDNA von Stromazellen nicht-epithelialen Ursprungs, wie Fibroblasten oder Makrophagen. Das rekombinierte Smo^{loxP} -Allel ließ sich im geringen Maße aus der gDNA der Thymozyten amplifizieren. Dieses Amplikon läßt sich durch die Anwesenheit von Thymusepithelzellen erklären, die sich bei der mechanischen Behandlung des Thymus aus dem Stromaverband gelöst haben.

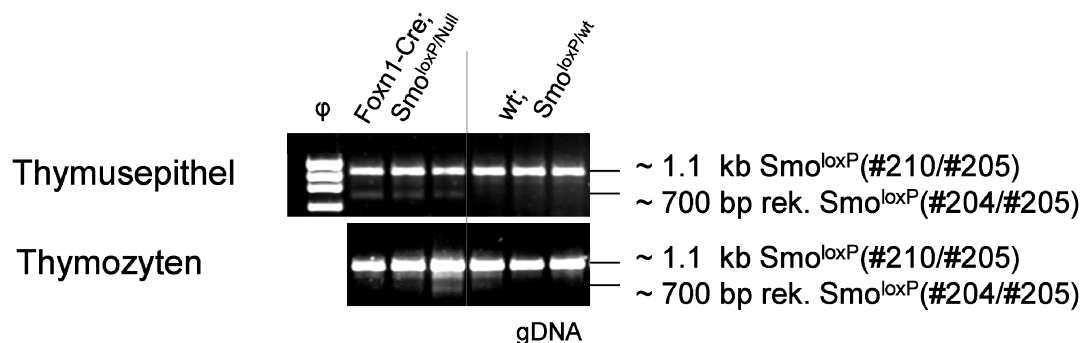


Abb.3.13: Rekombinationsnachweis des Smo^{loxP} -Allels durch PCR-Analyse. In dem Thymusepithel und in den Thymozyten der $\text{Foxn1-Cre;Smo}^{\text{loxP/Null}}$ -Tiere konnte das rekombinierte Smo^{loxP} -Allel (~700 bp; Primer #204 und #205) nachgewiesen werden. Zur Kontrolle diente hier die Amplifikation des intakten Smo^{loxP} -Allels (~ 1.1 kb; Primer #210 und #205). Die Tiere wurden in einem Alter von 1-4 Monaten analysiert. Exemplarisch zeigt diese Abbildung den Größenstandard (ϕ : X147 RF DNA / Hae III), der für die Ermittlung der Amplikon-Längen verwendet wurde.

Die spezifische PCR-Analyse des rekombinierten Smo^{loxP} -Allels in den mechanisch getrennten Thymusfraktionen (T-Zellen und Thymusstroma) der $\text{Foxn1-Cre;Smo}^{\text{loxP/Null}}$ -Mäuse lässt auf eine effiziente Cre-Rekombination im Thymusepithel dieser Tiere schließen.

3.2.2 Nachweis des rekombinierten $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$ -Allels

Bei diesen Tieren wurde die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges durch die Expression einer dominant aktiven Mutante des Smo-Proteins (SmoM2) gewährleistet. Mit Hilfe einer Cre-Rekombinase wurde die loxP-flankierte STOP-Kassette des transgenen $\text{R26}^{\text{SmoM2}}$ -Allels deletiert. Der Verlust der STOP-Sequenz führte im Folgenden zur Expression des SmoM2 -Proteins, spezifisch in derjenigen

Zellpopulation oder desjenigen Gewebes, in der oder dem die Cre-Rekombinase exprimiert wurde.

Hämatopoetische Stammzellen-spezifische Aktivierung des R26^{SmoM2}-Allels mit Hilfe des HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgens

Um die HSC-SCL-Cre-ER^T-vermittelte Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels nachzuweisen, wurde eine spezifische PCR-Analyse durchgeführt.

Bei den SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Mäusen führte die Rekombination des Allels zum Verlust der STOP-Kassette und somit zur Expression des SmoM2-Proteins spezifisch in den hämatopoetischen Stammzellen der Tiere, vorausgesetzt die Translokation der Cre-ER^T-Rekombinase aus dem Zytoplasma in den Nukleus wurde durch die Applikation von TAM induziert. Die Funktionalität des Cre/loxP-Systems wurde mittels PCR-Analysen ausgehend von der gDNA der Knochenmarkzellen der TAM-behandelten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Kontrolltiere nachgewiesen. Die Rekombination des Allels konnte mittels spezifischer Primer nachgewiesen werden, die in der SA (engl.: *splice acceptor*)-Sequenz des R26-Vektors (Primer #156) und in der Sequenz des SmoM2 (Primer #181) hybridisieren (Abb.3.14A und B).

Um nachzuweisen, dass die SmoM2-Mutante transkribiert wurde, wurden ein *forward*-Primer (#183) generiert, der in Exon 9 des Smo-Gens bindet und ein *reverse*-Primer (#184), der spezifisch für die mutierte Region, an der Stelle 2123 (cDNA-Sequenz aus NCBI: NM_176996) der Basensequenz ansetzt. An dieser Stelle ist die Base Guanidin durch Thymin ersetzt. Die Smo-Punktmutation in Exon 9, die für die konstitutive Aktivierung des SmoM2-Rezeptors verantwortlich ist, konnte mit Hilfe dieser Primer im Knochenmark der Tiere nachgewiesen werden (Abb.3.14C und D).

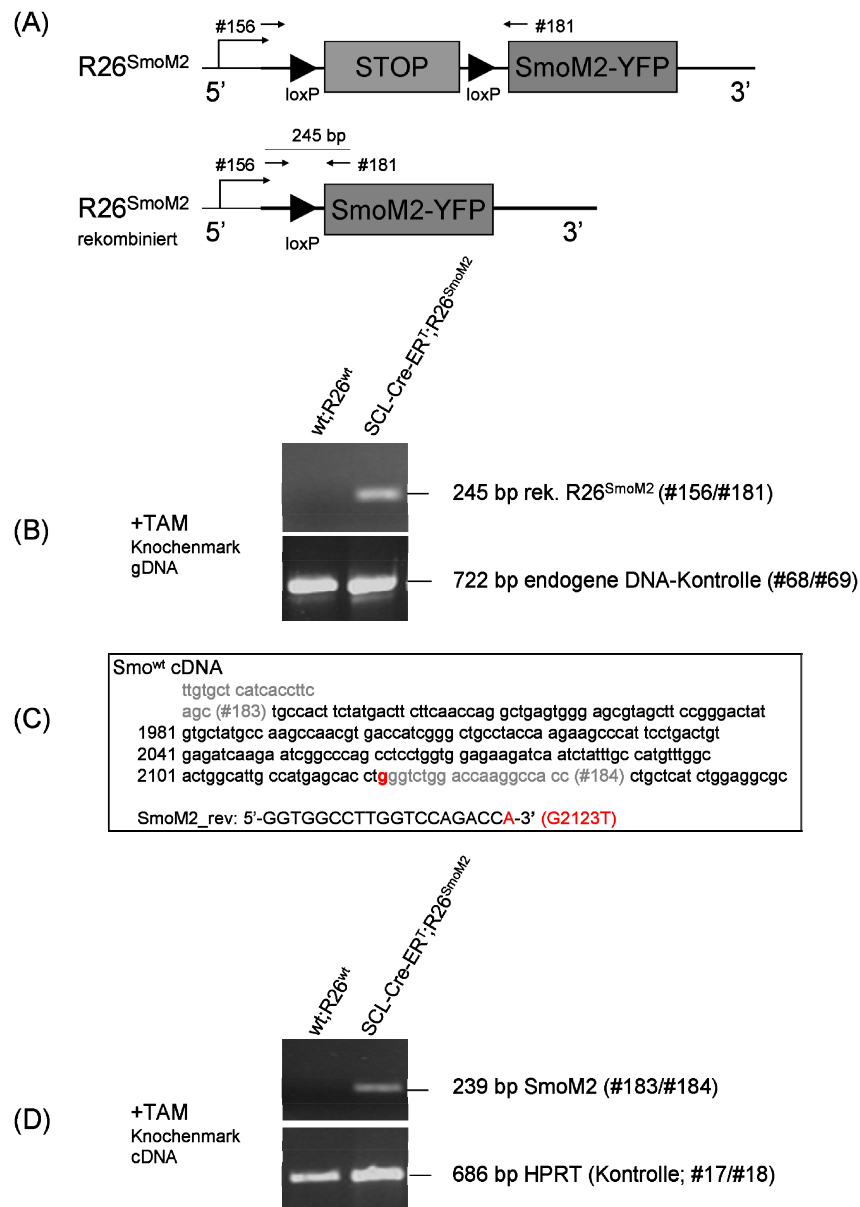


Abb.3.14: PCR-Strategien zum Nachweis des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels und der SmoM2-Expression in Knochenmarkszellen. (A) Schematische Darstellung des nicht-rekombinierten und rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels. Die verwendeten Primer (#156 und #181) sind als schwarze Pfeile dargestellt. (B) Das rekombinierte R26^{SmoM2}-Allel konnte im Knochenmark durch eine PCR-Analyse aus der gDNA des Knochenmarks der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere nachgewiesen werden. Als endogene DNA-Kontrolle diente die Amplifikation einer Teilsequenz des SCL-Lokus (722 bp; Primer #68 und #69). Die Tiere wurden 3 Monate mit TAM-Futter behandelt und anschließend nach 4 Monaten im Alter von 9 Monaten analysiert. (C) An Stelle 2123 (bp der cDNA aus NCBI: NM_176996) des Smo-Gens in Exon 9 befindet sich die Base Guanidin, welche in der Mutation 2 durch ein Thymin ersetzt wurde. Das 3'-Ende des Mutation-spezifischen Primers (#184) setzt an dieser Punktmutation an. Der *forward*-Primer bindet in Exon 9 der Smo^{wt}-Sequenz (#183). Grau, Primersequenzen; rot, Punktmutation. (D) Es konnte ebenfalls die Expression der SmoM2-mRNA im Knochenmark der Tiere nachgewiesen werden (239 bp; Primer

#183 und #184). Als Kontrolle diente die Amplifikation von Sequenzen eines *house keeping*-Gens (HPRT-Gen; 686 bp; #17 und #18).

Diese spezifischen PCR-Analysen zeigten, dass die Cre-vermittelte Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere erfolgreich war und die SmoM2-mRNA transkribiert wurde.

Hämatopoetische Stammzellen- und Progenitoren-spezifische Expression des R26^{SmoM2}-Allels mit Hilfe des Vav-iCre-Transgens

Um die Vav-iCre-vermittelte Rekombination in allen hämatopoetischen Zellen nachzuweisen, wurde die PCR-Analyse zur Detektion des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels gewählt. Die Vav-iCre-Rekombinase wurde spezifisch in allen hämatopoetischen Zellen der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse exprimiert und dementsprechend wurde durch die Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels die Expression des konstitutiv aktiven SmoM2-Rezeptors induziert. Für die PCR-Analyse wurde die gDNA aus dem Knochenmark der Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und Kontrolltiere eingesetzt.

Mit Hilfe der spezifischen Primerkombinationen (#156/#181 und #183/#184; Abb.3.14A und C) konnte zum einen die Deletion der STOP-Kassette aus der gDNA und zum anderen die Expression des SmoM2-Gens aus der cDNA des Knochenmarks der experimentellen Tiere nachgewiesen werden (Abb.3.15).

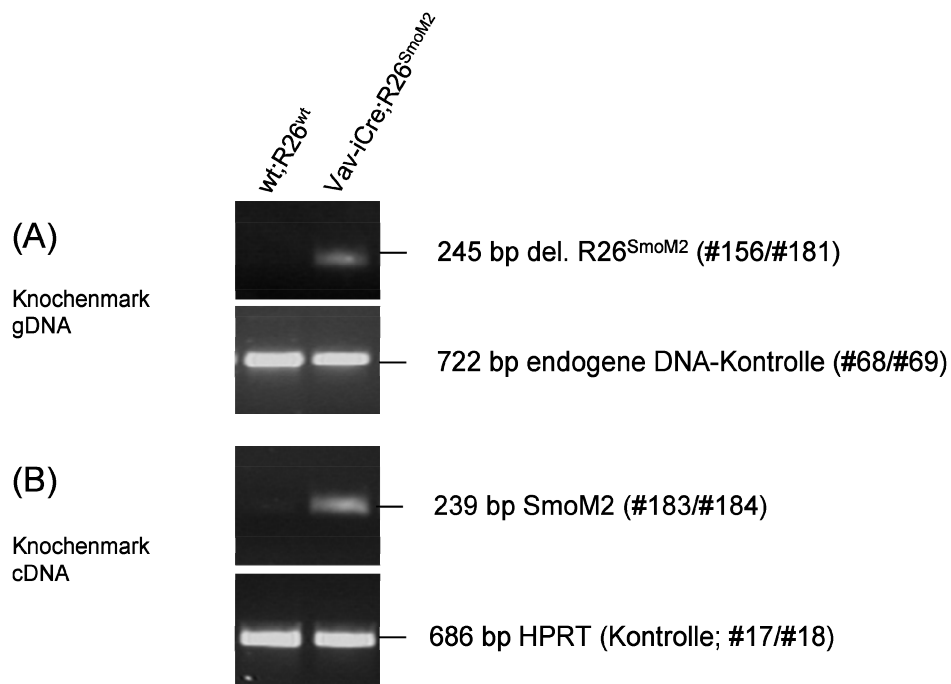


Abb.3.15: PCR-Nachweise der Rekombination des *R26^{SmoM2}*-Allels und der *SmoM2*-Expression in Knochenmarkszellen. (A) Das rekombinierte *R26^{SmoM2}*-Allel konnte mittels PCR-Analyse im Knochenmark der *Vav-iCre;R26^{SmoM2}*-Tiere nachgewiesen werden (245 bp; Primer #156 und #181). Als Kontrolle diente die Amplifikation einer Teilsequenz des *SCL*-Lokus (722 bp; Primer #68 und #69). (B) Die Expression des *SmoM2*-Gens konnte im Knochenmark der Tiere detektiert werden (239 bp; Primer #183 und #184). Als Kontrolle diente die Amplifikation von Sequenzen eines *house keeping*-Gens (*HPRT*-Gen; 686 bp; Primer #17 und #18). Die Tiere wurden in einem Alter von 1-3 Monaten analysiert.

Die Funktionalität des genetischen Systems bezüglich der Expression des *SmoM2*-Proteins wurde darüber hinaus über dessen biologischen Effekt in nicht-hämatopoetischen Organen ersichtlich.

Die *Vav-iCre;R26^{SmoM2}*-Mäuse wiesen in einem Zeitraum von etwa 10-15 Wochen einen schlechten Habitus, eine ataktische Gangstörung und einen Hydrozephalus-ähnlichen Phänotyp auf. Die erkrankten Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Gehirne der betroffenen Tiere wurden präpariert, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Die lichtmikroskopische Analyse dieser Paraffinschnitte ergab eindeutig die Diagnose eines cerebellären Medulloblastoms bei diesen Tieren (Abb.3.16). Da bekannt ist, dass die Aktivierung des Hh-Signalweges an der Pathogenese von Medulloblastomen beteiligt ist, ist davon auszugehen, dass diese Malignome in den *Vav-iCre;R26^{SmoM2}*-Mäusen durch die

aberrante SmoM2-Expression in cerebellären Zellen verursacht wurde (Goodrich und Scott, 1998; Ingham, 1998). Es existieren zudem Hinweise, dass das Vav-iCre-Transgen in einer kleinen Population von cerebellären Zellen aktiv ist (de Boer et al., 2003).

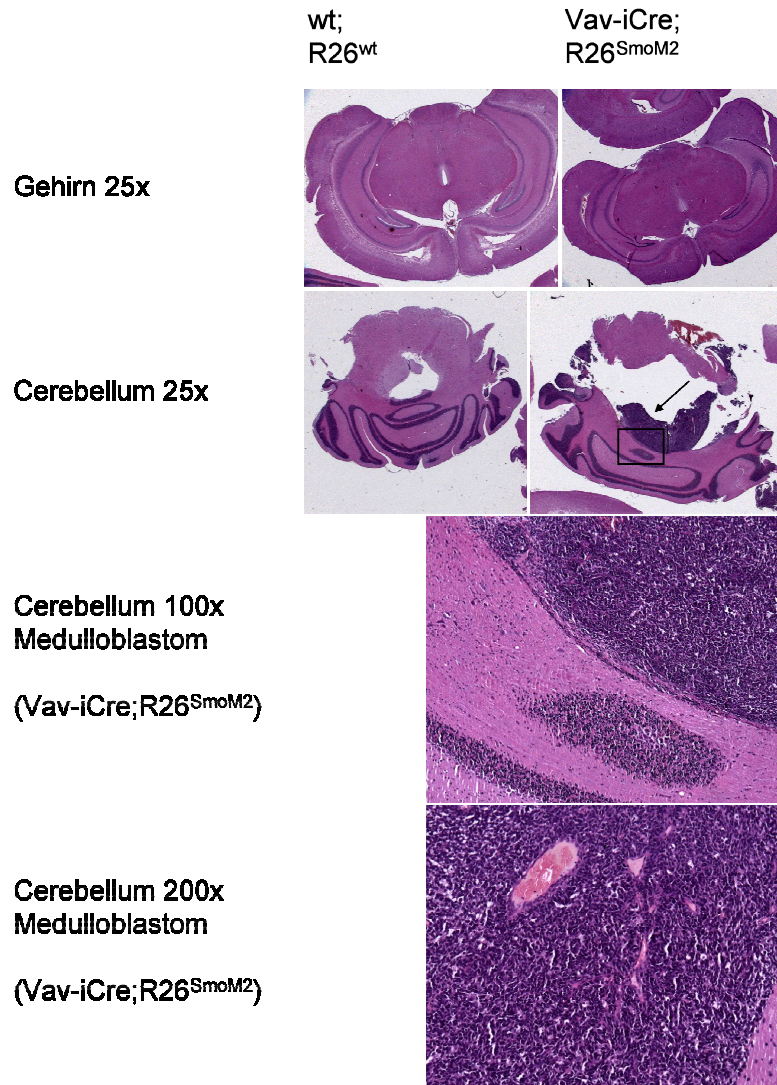


Abb.3.16: Exemplarische HE-Färbung des Gehirns und des Kleinhirns (Cerebellum) von Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und Kontrolltieren. Paraffinschnitte des Cerebellums der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere und von Kontrolltieren in unterschiedlichen Vergrößerungen (25x-200x). Das Großhirn der Tiere ist völlig frei von malignem Gewebe. Das mit einem Pfeil gekennzeichnete Medulloblastom, ausgehend von der Körnerschicht (dunkelgefärbtes Zellband) des Kleinhirns, wurde nur in den SmoM2-exprimierenden Tieren nachgewiesen.

Zusammengefasst zeigten die PCR-Analysen, dass auf der Ebene der genomischen DNA die Vav-iCre-vermittelte Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels erfolgreich verlief, und dass die cDNA-Sequenz des mutierten Smo-Rezeptors

transkribiert wurde. Der biologische Effekt des SmoM2-Rezeptors wies zudem auf die Translation des SmoM2-Proteins und dessen Funktionalität hin. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass die Expression des SmoM2-Rezeptors in Vav-exprimierenden Zellen des Cerebellums die Entstehung eines Medulloblastoms verursachte.

R26^{SmoM2}-Expression innerhalb von B-Zellen mit Hilfe des CD19-Cre-knockin-Allels

Mit Hilfe der CD19-Cre-Rekombinase wurde das R26^{SmoM2}-Allel in den frühen und reifen B-Lymphozyten rekombiniert und somit die SmoM2-Expression aktiviert. Für den Nachweis des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels wurde aus den Zellen der Milz und des Knochenmarks gDNA isoliert und für eine spezifische PCR-Analyse eingesetzt. In der Milz und dem Knochenmark von CD19-Cre;R26^{SmoM2}-Tieren konnte die Deletion der STOP-Kassette des R26^{SmoM2}-Allels nachgewiesen werden (Abb.3.17). Da die B-Lymphozyten im Knochenmark und der Milz nur einen Teil der Gesamtzellen ausmachen waren die amplifizierten Produkte des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels nur schwach nachweisbar. Zudem ist ein Intensitätsunterschied zwischen Milz und Knochenmark zu beobachten, was durch die höhere Effizienz der CD19-Cre-Rekombinase in reiferen B-Zellen zu erklären ist, die vorwiegend in der Milz zu finden sind.

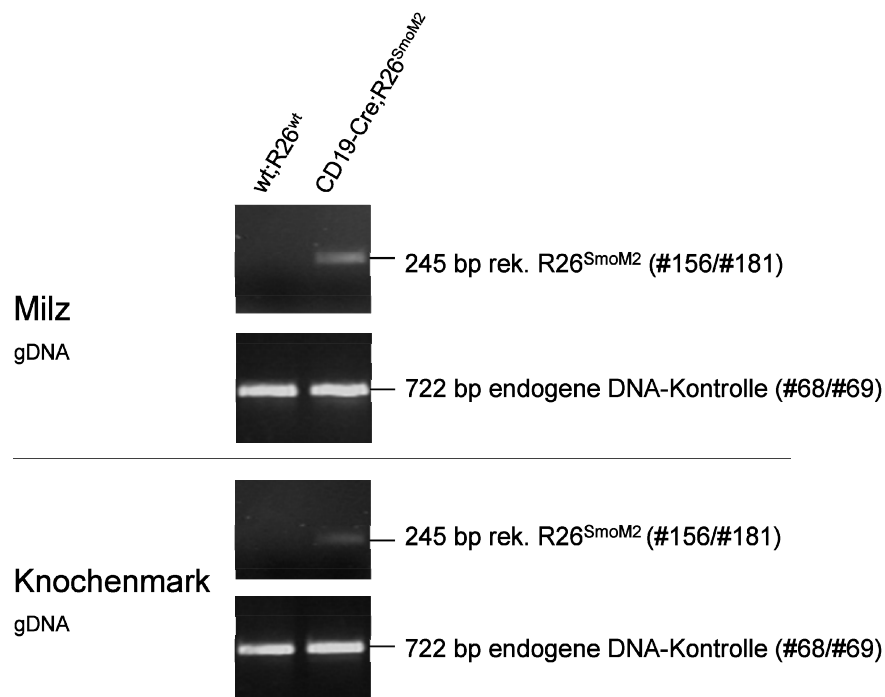


Abb.3.17: Rekombinationsnachweis des $R26^{SmoM2}$ -Allels mittels PCR-Analyse in Knochenmark und Milz von $CD19-Cre;R26^{SmoM2}$ - und Kontrolltieren. Das rekombinierte $R26^{SmoM2}$ -Allel (245 bp; Primer #156 und #181; Abb.3.14 A und C) konnte in der Milz und im Knochenmark der $CD19-Cre;R26^{SmoM2}$ -Tiere nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente die Amplifikation einer Teilsequenz des SCL-Lokus (722 bp; Primer #68 und #69). Die Tiere wurden in einem Alter von 1,5 Jahren analysiert.

Die Ergebnisse der PCR-Analysen sprachen für eine erfolgreiche zellspezifische $CD19-Cre$ -vermittelte Rekombination des $R26^{SmoM2}$ -Allels in den B-Lymphozyten der Milz und des Knochenmarks von $CD19-Cre;R26^{SmoM2}$ -Mäusen.

$R26^{SmoM2}$ -Expression innerhalb des Thymusepithels mit Hilfe des $Foxn1-Cre$ -knockin-Allels

Die Rekombination des $R26^{SmoM2}$ -Allels und die Expression des konstitutiv aktiven Rezeptors sollte spezifisch im Thymusepithel der $Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}$ -Mäuse erfolgen, vorausgesetzt die $Foxn1-Cre$ -Rekombinase wurde in diesem Gewebe exprimiert. Um die Cre -vermittelte Rekombination des $R26^{SmoM2}$ -Allels nachzuweisen, wurde versucht mittels oben beschriebener PCR-Analyse aus der gDNA des Thymusstromas der $Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}$ -Mäuse das Rekombination-

spezifische PCR-Produkt zu amplifizieren (Abb.3.18). Der Nachweis des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels verlief positiv.

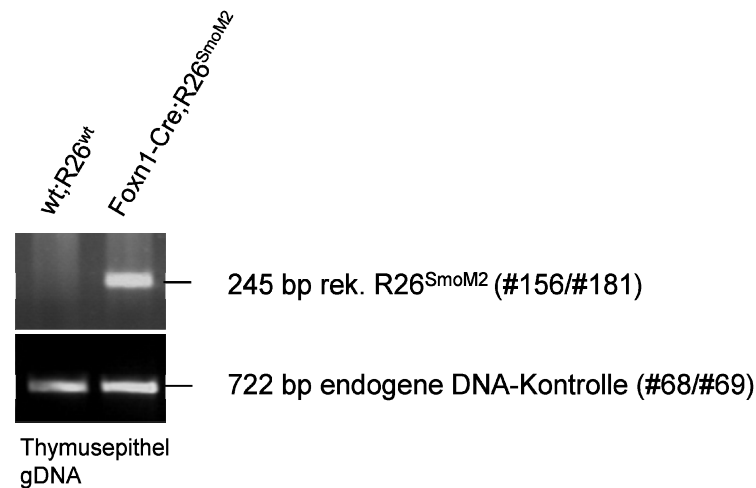


Abb.3.18: Rekombinationsnachweis des R26^{SmoM2}-Allels mittels PCR-Analyse im Thymusstroma. Das rekombinierte R26^{SmoM2}-Allel (245 bp; Primer #156 und #181) konnte im Thymusstroma der Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente die Amplifikation einer Teilsequenz des SCL-Lokus (722 bp; Primer #68 und #69). Die Tiere wurden in einem Alter von 2 Monaten analysiert.

Ein funktioneller Nachweis des SmoM2-Proteins erfolgte in den Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tieren ebenfalls durch einen biologischen Effekt. Die Mutation des Smo-Rezeptors ist in Zusammenhang mit der Entstehung von Basaliomen bekannt (Lupi, 2007). Die Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere entwickelten nach 6-12 Wochen aus den basalen Schichten der Haarfollikel Basaliom-ähnliche Läsionen. Das Foxn1-Gen ist an der Entwicklung der Haarfollikel und der Haut beteiligt und wird dementsprechend in einzelnen Zellsubtypen der Haut exprimiert (Gordon et al., 2007). Die betroffenen Hautareale der Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere wurden isoliert und mittels HE-Färbung mikroskopisch analysiert (Abb.3.19).

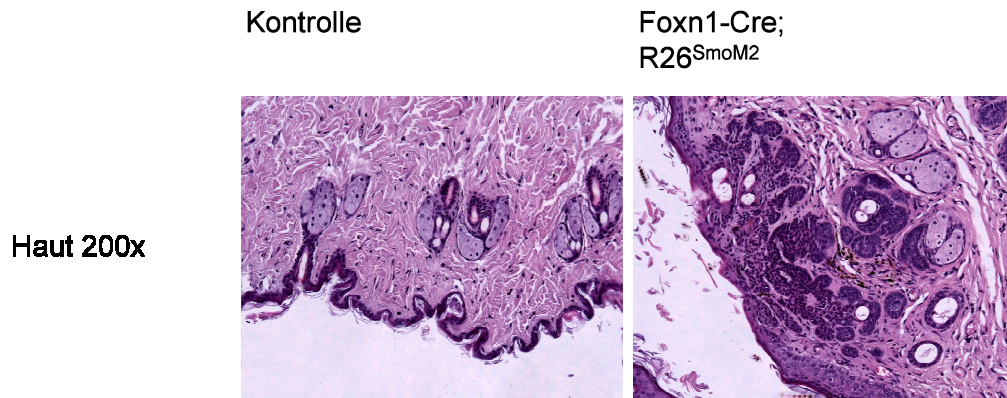


Abb.3.19: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Hautschnitten von Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tieren und Kontrollen. Die Haut (200x Vergrößerung) zeigt deutlich proliferierende Basaliom-ähnliche Veränderungen ausgehend vom Epithel der basalen Schichten der Epidermis und der Haarfollikel in Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tieren.

Der spezifische PCR-Nachweis für die Foxn1-vermittelte Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels zeigte die erfolgreiche Deletion der STOP-Kassette im Thymusstroma. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression des mutierten Smo-Rezeptors in einzelnen Haarfollikeln der Tiere zu einer Ausbildung von Basaliom-ähnlichen Läsionen führte.

3.2.3 Durchflusszytometrischer Nachweis des SmoM2-YFP-Proteins

Die oben angeführten PCR-Nachweise zeigten die erfolgreiche Rekombination der Zielsequenzen in den unterschiedlichen Cre/loxP-Systemen auf genomischer Ebene. Um speziell die Translation des gewünschten Produktes, in diesem Fall des SmoM2-Proteins zu prüfen, wurden der direkte Nachweis des SmoM2-YFP-Fusionsproteins (Kap.2.2) und ein indirekter Nachweis gewählt.

Der direkte Nachweis des SmoM2-YFP-Fusionsproteins wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen der Zelloberfläche von CD19-Cre;R26^{SmoM2}-transgenen B-Zellen erbracht (Abb.3.20A). Die Fluoreszenzintensität des YFP (engl.: *yellow fluorescent protein*)-Signals war abhängig vom Genotyp der R26^{SmoM2}-Tiere. Wie erwartet wiesen homozygote R26^{SmoM2}-Mäuse ein stärkeres YFP-Signal auf als heterozygote R26^{SmoM2}-Tiere.

Das Fusionsproteins konnte zudem durch einen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen GFP (engl.: *green fluorescent protein*) /YFP nachgewiesen werden (Abb.3.20B).

Zusammenfassend weisen die durchflusszytometrischen Analysen auf eine Cre-spezifische Expression des SmoM2-Proteins in B-Zellen hin.

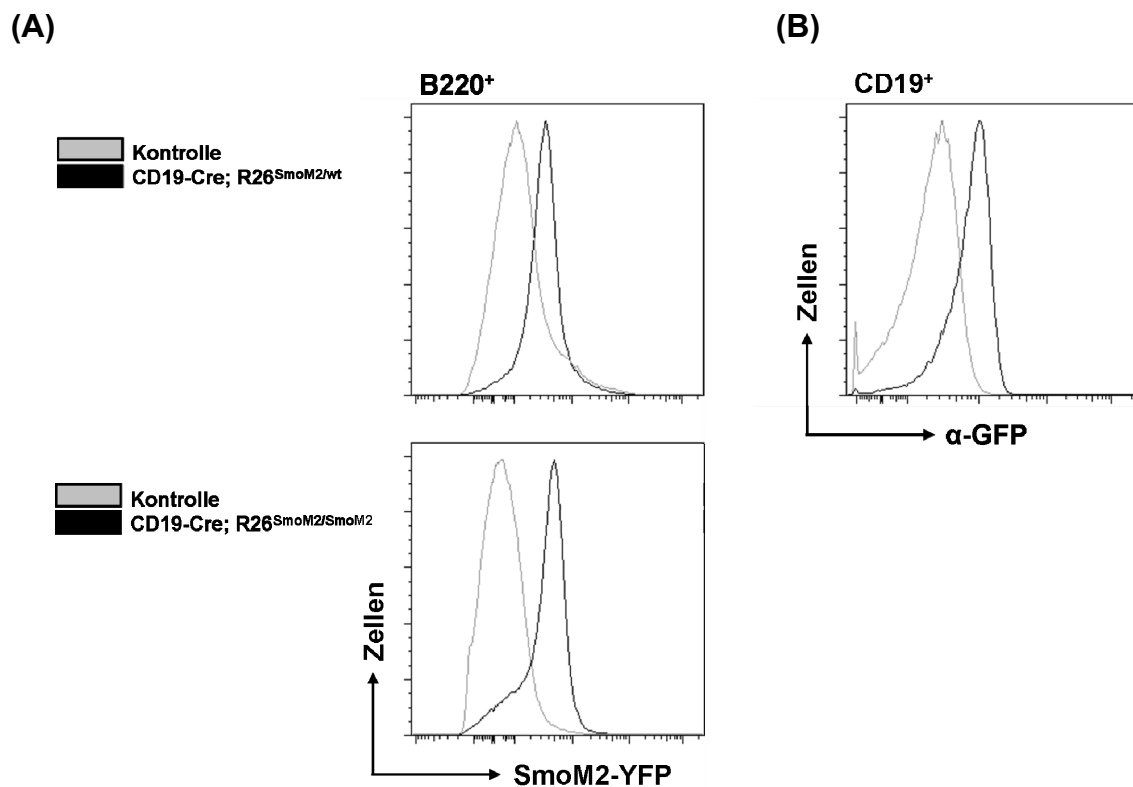


Abb.3.20: Durchflusszytometrischer Nachweis der SmoM2-Expression. (A) Direkter durchflusszytometrischer Nachweis des SmoM2-YFP-Fusionsproteins und (B) indirekter Nachweis mittels Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers gegen den YFP-Anteil (α -GFP) des Proteins auf den B-Zellen der Milz von R26^{SmoM2}-heterozygoten und R26^{SmoM2}-homozygoten CD19-Cre;R26^{SmoM2}-Tieren (schwarz) und den jeweiligen Kontrolltieren (grau).

Für alle genetischen Modelle, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, konnte in Kap.3.2 gezeigt werden, dass die Cre-vermittelte Rekombination der loxP-flankierten Sequenzen innerhalb der Hämatopoese und des Thymusstromas erfolgreich war.

Zudem konnte ein biologischer Effekt des exprimierten SmoM2-Proteins in Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Mäusen beobachtet werden, was für die Funktionalität des SmoM2-Rezeptors in den Cre-exprimierenden Zellen spricht.

3.3 Das hämatopoetische System in Smo-defizienten Tieren

Einfluss der Smo-Inaktivierung

Um die Rolle des Hh-Signalweges im hämatopoetischen System zu untersuchen, wurden Mäuse gezüchtet, die einen Hämatopoese-spezifischen *Smo-knockout* aufwiesen. Da der ubiquitäre *Smo*-Verlust zu embryonaler Letalität führt (Zhang et al., 2001), wurde zunächst untersucht, ob die Nachkommen der letzten Kreuzung (F2, siehe Abb.3.1 in Kap.3.1) entsprechend der Mendel'schen Regeln geboren wurden. Somit wurde ausgeschlossen, dass die Deletion des *Smo*-Exon 1 durch die Vav-iCre-vermittelte Rekombination des *Smo*^{loxP}-Allels *in utero* zu einer Selektion der Vav-iCre;*Smo*^{loxP/Null}-Tiere führte (Tab.3.1).

Tab.3.1: Genotyp-Verhältnis der F2-Generation bei der Zucht von Vav-iCre;*Smo*^{loxP/Null}-Mäusen. Die Analyse von 9 Würfen und insgesamt 68 Tieren im Alter von 3-4 Wochen ergab das in der Tabelle dargestellte prozentuale Verhältnis und die absolute Verteilung der möglichen Genotypen. Der p-Wert wurde über den Chi-Quadrat-Anpassungstest ($\chi^2 = 3,65$; 3 d.f.) ermittelt. Die vier Genotypen entsprechen der Verteilung nach den Mendel'schen Regeln. Die erwartete Verteilung lag bei 25 % für jeden Genotyp. n, Anzahl.

Genotyp	Vav-iCre; <i>Smo</i> ^{loxP/Null}	Vav-iCre; <i>Smo</i> ^{loxP/wt}	wt; <i>Smo</i> ^{loxP/Null}	wt; <i>Smo</i> ^{loxP/wt}	p-Wert
%	16,2	25	32,3	26,5	0,302
n	11	17	22	18	

Da keine signifikante Abweichung in der Normalverteilung nach den gängigen Mendel'schen Vererbungsregeln (hier Regel 3; Neurekombinationsregel) des Genotyp-Verhältnisses in der F2-Generation beobachtet wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass der Hämatopoese-spezifische *Smo-knockout* mit keiner prä- oder perinatalen Letalität assoziiert war.

Bisherige Untersuchungen sprechen dafür, dass das nicht-rekombinierte *Smo*^{loxP}-Allel der Funktion eines *Smo*^{wt}-Allels entspricht (Long et al., 2001). Deshalb wurden die beiden Genotypen (*Smo*^{loxP/wt} und *Smo*^{wt/wt}) als Kontrollgruppe (Kontrolle) zusammengefasst.

Im Vorfeld der detaillierten Analyse der Organe Thymus, Milz und Knochenmark von Hämatopoese-spezifischen *Smo*-defizienten Tieren wurden die absoluten

Zellzahlen der Organe, wie in Kap.2.2.1 beschrieben, ermittelt (Abb.3.21). Die isolierten Organe der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere waren makroskopisch nicht auffällig.

Die Zellzahlen der jeweiligen Organe wiesen keine signifikanten Differenzen auf. Dies bedeutet, dass die Gesamtzellzahlen von Thymus, Knochenmark und Milz durch den genetischen Smo-Verlust unbeeinflusst blieben.

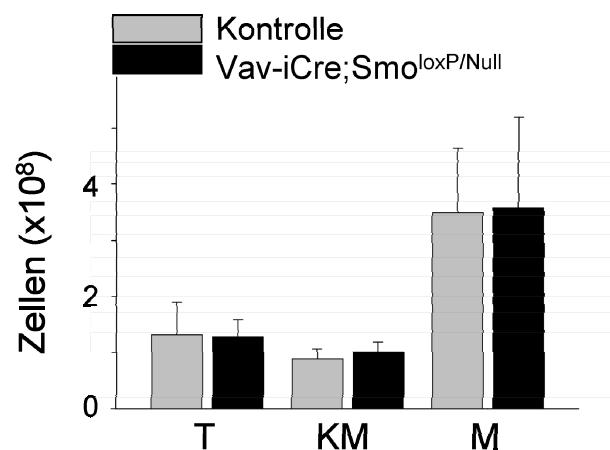


Abb.3.21: Gesamtzellzahl der Organe Thymus, Knochenmark und Milz von Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäusen und Kontrolltieren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der absoluten Zellzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) ermittelt werden ($p > 0,05$). Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere (T), $n=4$; Kontrolltiere (T), $n=4$; Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere (KM), $n=6$; Kontrolltiere (KM), $n=9$; Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere (M), $n=6$; Kontrolltiere (M), $n=8$; T, Thymus; KM, Knochenmark; M, Milz.

3.3.1 Untersuchung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorpopulationen in Smo-defizienten Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hh-Signalweg durch den spezifischen genetischen Verlust des Smo-Exon 1 in hämatopoetischen Zellen untersucht. Zur Untersuchung des konditionalen Smo-*knockout* in den hämatopoetischen Stammzellen und Progenitoren wurden SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- Mäuse verwendet. Die Folgen des Smo-Verlustes wurden vornehmlich mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

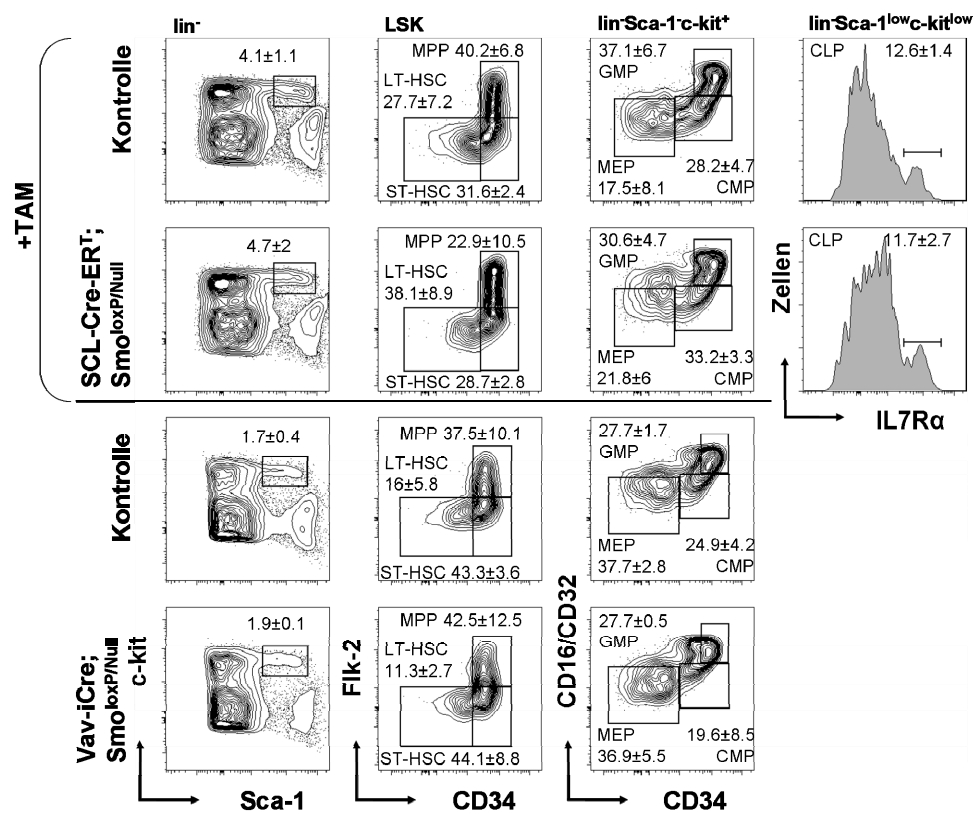
Nachdem die konditionalen Smo-*knockout*-Tiere in der erwarteten Frequenz geboren wurden und die hämatopoetischen Organe makroskopisch keine Auffälligkeiten gezeigt hatten, wurde das Vorhandensein und die Größe der

hämatopoetischen Stammzell- und multipotenten Progenitorpopulationen mit etablierten Oberflächenmarkern analysiert. Die LT (engl.: *long term*)-HSC der Maus ist über ihre Oberflächenantigene den Stammzellfaktor-Rezeptor c-kit und Sca-1 (engl.: *stem cell antigen*; dt.: Stammzell-Antigen) definiert. Teil der Definition ist zusätzlich die Negativität der Stammzelle für die Marker reifer hämatopoetischer Linien (Abb.2.14). Mit dem sogenannten Linienmix (kurz: lin) war es möglich unreife Progenitorzellen einzugrenzen (engl.: *to gate*) und mit Hilfe der c-kit- und Sca-1-Oberflächenmoleküle näher zu charakterisieren. Diese Progenitorzellen, die die Marker c-kit und Sca-1 auf der Oberfläche exprimieren und keine Linienmarker aufweisen, werden unter der Bezeichnung LSK zusammengefasst ($\text{lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$). Untersucht man die unreife Population der LSK-Zellen auf ihre Expression von CD34 und ihre Expression von Flk-2 (engl.: *fetal liver kinase 2*; oder FLT3) ist es möglich diese Populationen weiter in LT-HSC ($\text{CD34}^- \text{Flk-2}^-$), in ST (engl.: *short term*; $\text{CD34}^+ \text{Flk-2}^-$)-HSC und in MPP ($\text{CD34}^+ \text{Flk-2}^+$) zu unterteilen (Christensen und Weissman, 2001). LT- und ST-HSC wurden über ihre unterschiedliche Selbsterneuerungskapazität in Transplantationsexperimenten definiert. In der Selbsterneuerungshierarchie des hämatopoetischen Systems gilt die LT-HSC, als die unreifste HSC mit der höchsten Kapazität zur Etablierung eines vollständigen Blutsystems, gefolgt von der ST-HSC und den MPP. In der Maus macht die LT-HSC Population etwa 0,01-0,05% der Knochenmarkszellen aus (Morrison et al., 1995). Die Populationen der Progenitoren der myeloischen Linie GMP, CMP und MEP werden ebenfalls über die Expression von c-kit und über die unterschiedliche Expression der Oberflächenmarker CD34 und CD16/CD32 (siehe Kap.2.1.6, Tab.2.2) definiert. Zudem werden die myeloischen Vorläufer über die fehlende Expression des Sca-1-Moleküls definiert (Akashi et al., 2000) (Abb.3.22).

signifikant von den Werten der jeweiligen Kontrolltiere abweichen. Die in Abb.3.23A (oben) abgebildeten durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden von SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Tieren generiert, die zwei Wochen mit Tamoxifen (TAM) behandelt wurden und anschließend fünf Wochen später im Alter von 7 Monaten analysiert wurden. Durchflusszytometrische Nachweise von SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Tieren, die 10 Wochen mit TAM behandelt wurden und eine Woche später im Alter von 4 Monaten analysiert wurde, ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Stamm- und Progenitorpopulationen.

Diese durchflusszytometrischen Daten sprechen dafür, dass für den Erhalt normaler HSC und Progenitoren der Hh-Signalweg über den Smo-Rezeptor entbehrlich ist. Grundlage dieser Schlussfolgerung ist der Nachweis eines effizienten genetischen Smo-Verlustes in nahezu 100% der Knochenmarkzellen (Kap.3.2).

(A)



(B)

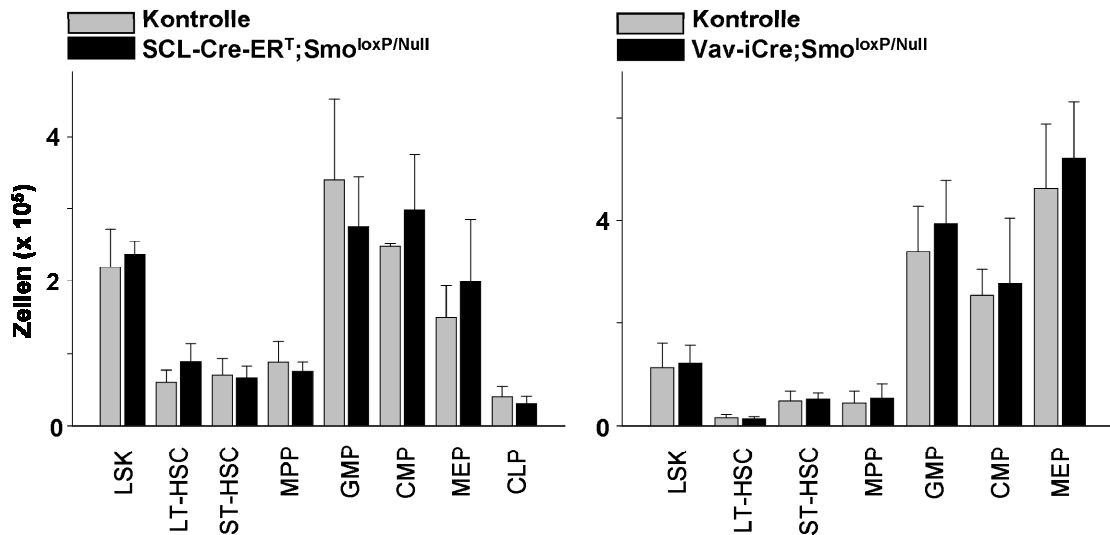


Abb.3.23: Durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Stammzell- und Progenitorpopulationen im Knochenmark von TAM-induzierten *SCL-Cre-ERT;Smo^{loxP/Null}*- und konstitutiven *Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}*- Mäusen. (A) Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) der verschiedenen Zellpopulationen und ihre prozentualen Anteile (Mittelwert ± Standardabweichungen) der eingegrenzten Population (siehe *gating*-Strategie in Abb.3.22). Die *SCL-Cre-ERT;Smo^{loxP/Null}*- und die Kontrolltiere dieses Experimentes wurden 2 Wochen mit Tamoxifen (TAM) behandelt und 5 Wochen nach TAM-Applikation im Alter von 7 Monaten

analysiert. Die Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere wurden in einem Alter von 2-6 Monaten analysiert. SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Tiere, n=3; Kontrolltiere, n=3; Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere, n=8; Kontrolltiere, n=8. (B) Graphische Darstellung der errechneten absoluten Zellzahlen. Die absoluten Zellzahlen aller Subpopulationen der transgenen Tiere im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

Um zu untersuchen, ob der genetische Smo-Verlust in der Hämatopoese einen Einfluss auf die Expression von Zielgenen des Hh-Signalweges hatte, wurde die Expression der Hh-Zielgene Ptch und Gli1 analysiert. Die Wahl fiel auf die Hh-Zielgene Ptch und Gli1, da sie selbst Komponenten des Signalweges darstellen und demnach an dem regulatorischen *feedback loop* des Hh-Signalweges beteiligt sind. RT-PCR-Analysen der Expression dieser Zielgene aus der cDNA des Knochenmarks der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere zeigten keine ausgeprägten Expressionsunterschiede in einem konventionellen Agarosegel im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb.3.24).

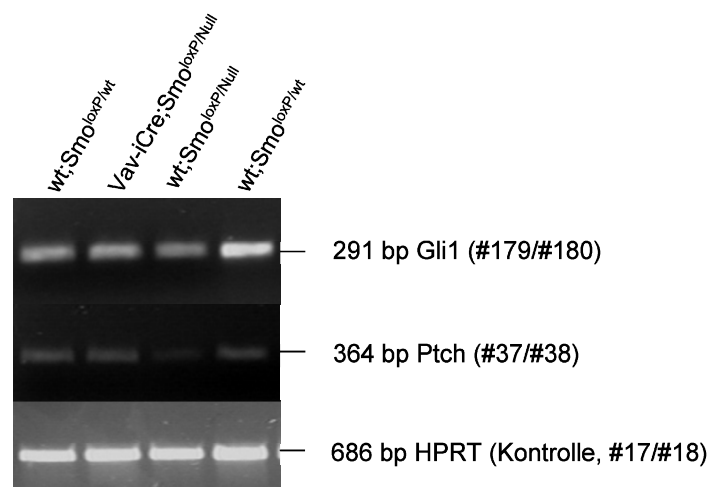


Abb.3.24: Expressionsnachweis der Hh-Zielgene Ptch und Gli1 durch RT-PCR-Analyse in Knochenmarkszellen der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere und Kontrolltiere. Die Abbildung zeigt die spezifischen PCR-Produkte der Gli1- (291 bp) und Ptch-Transkripte (364 bp) sowie die Expression einer Teilsequenz eines *house keeping*-Gens (HPRT-Gen; 686 bp; Primer #17 und #18) zur Kontrolle. Es wurden die Primer #37 und #38 für die Amplifikation der Ptch-cDNA und die Primer #179 und #180 für Gli1 verwendet (siehe Kap.7, Tab.7.4). Die Tiere wurden im Alter von 2-6 Monaten analysiert.

Da mittels konventioneller RT-PCR-Analyse keine qualitativen Unterschiede in der Expressionsintensität der Zielgene zu beobachten war, wurde im Folgenden eine quantitative Methode zur Untersuchung der Hh-abhängigen Expression verwendet. Der quantitative *real-time* RT-PCR-Nachweis (kurz: qPCR) aus der cDNA der Knochenmarkzellen der SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Mäuse zeigte eine tendenzielle Abnahme der Expression der Transmembranrezeptoren Ptch und Smo durch den induzierten Smo-Verlust. Im Gegensatz zu den SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Mäusen war die Transkription von Ptch in den Zellen der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere nicht verringert, jedoch konnte auch bei diesen Tieren, wie zu erwarten, ein Trend in Richtung geringerer Smo-Expression verzeichnet werden. Die Expression des Hh-Zielgens BMP4 war sowohl in den SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- als auch im Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-System durch den Smo-Verlust unbeeinflusst. Die Auswertung der *real-time* RT-PCR-Ergebnisse erfolgte nur bis zum 35. Zyklus, um eine unspezifische Vervielfältigung auszuschließen. Die Amplifikation der Gli1-cDNA war mittels der beiden verwendeten TaqMan[®] Assays (siehe Kap.7, Tab.7.5) im Gegensatz zu der konventionellen RT-PCR-Analyse (Abb.3.24) nicht möglich. Eine Erklärung hierfür könnten die verschiedenen Primerkombinationen des TaqMan[®] Assays und der konventionellen RT-PCR-Analyse sein. Zudem wurde das PCR-Produkt der konventionellen RT-PCR-Analyse mit 40 PCR-Zyklen amplifiziert, während im Fall des qPCR-Nachweises die entsprechende cDNA nur bis zum 35. Zyklus analysiert wurde. Insofern muss von einer sehr niedrigen Gli1-Expression in den untersuchten Knochenmarkzellen ausgegangen werden. Die Expressionsanalyse von Smo sollte als zusätzliche Validierung des genetischen Systems fungieren. Aus der cDNA der SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse konnte trotz des genetischen Verlustes des Smo-Exon 1 jedoch nur eine tendenzielle Verminderung der Smo-Transkription nachgewiesen werden (Abb.3.25). Dies ist am ehesten damit zu erklären, dass der Smo-Primer des TaqMan[®] Assays den Abschnitt von Exon 2-3 des Smo-Transkriptes amplifiziert. Demnach ist wahrscheinlich, dass auch in Abwesenheit von Smo-Exon 1 eine mRNA transkribiert werden kann. Dies konnte durch die konventionelle RT-PCR-Analyse des Smo Exon 11-12 in Kap.3.2.1 bestätigt werden.

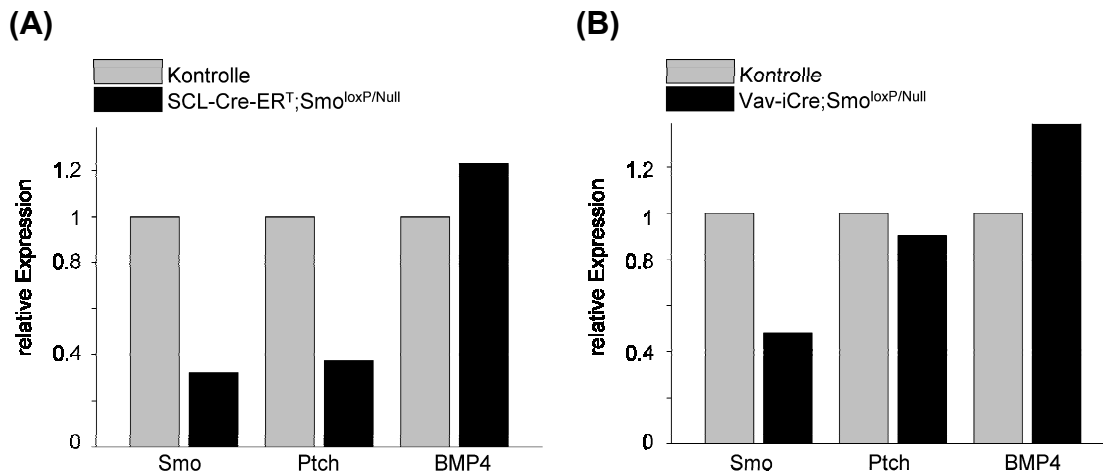


Abb.3.25: Real-time RT-PCR-Analyse der Hh-Zielgene Ptch und BMP4 sowie der Hh-Signalweg-Komponente Smo aus der cDNA der Knochenmarkzellen der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere. Die Expression von Smo und Ptch war besonders im SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Modell im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen vermindert. Die Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere zeigten ebenfalls eine tendenzielle Abnahme der Smo-Expression, jedoch keinen Unterschied in der Expression von Ptch zu den Wildtyp-Kontrollen. Die endogene Kontrolle (Expression der Kontrolltiere) ist in diesem Versuchsansatz mit der relativen Expression gleich eins gesetzt. Die SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Tiere wurden 2 Wochen mit TAM behandelt und in einem Alter von 7 Monaten, 5 Wochen nach Ende der TAM-Behandlung, analysiert. Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere wurden im Alter von 5 Monaten analysiert. SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Kontrolltiere, n=3; Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Kontrolltiere, n=3. Für die Bestimmung der Signifikanz wurden die δ Ct-Werte der individuellen Tiere herangezogen. Bezüglich der Smo-, Ptch- und BMP4-Expression ergab sich wahrscheinlich aufgrund der hohen Varianz kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen. Relative Expression in n-facher Änderung zur Kontrolle angegeben.

Die qPCR-Analyse von Smo und besonders Ptch im Knochenmark von Mäusen mit TAM-induziertem Smo-Verlust spricht dafür, dass die Ptch-Expression in hämatopoetischen Zellen positiv über den Hh-Signalweg reguliert wird. Im konstitutiven Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-System, in dem die Smo-Deletion schon seit der Embryonalentwicklung Bestand hat, könnte der Smo-Verlust möglicherweise zum Analysezeitpunkt bereits durch unbekannte Mechanismen kompensiert worden sein.

3.3.2 Der Einfluss der Inaktivierung des Hh-Signalweges auf die Ausreifung myelo-erythrozytärer Zellen

Da die Manipulation des Hh-Signalweges keinen Einfluss auf die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen und multipotenten Progenitoren ausübte, wurde die weitere Ausreifung der hämatopoetischen Linien mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

In der Literatur existieren Hinweise für den Einfluss des Hh-Signalweges auf die myeloische Linien-Differenzierung (Merchant et al., 2010). Der Transkriptionsfaktor Gli1, *downstream* des Smo-Rezeptors, ist in der Studie von Merchant *et al.* als Regulator der Proliferation und Differenzierung von myeloischen Progenitoren identifiziert worden. Da die durchflusszytometrischen Analysen der CMP, MEP und GMPs (Kap.3.3.1, Abb.3.23) im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine expandierten Zellzahlen aufwiesen, wurden die späteren Stadien der Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer und Erythrozyten auf das Vorhandensein und die Größe der Populationen ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert. Im Knochenmark der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse wurde die granulo-monozytäre Population mit Hilfe der Marker Mac-1 und Gr-1 detektiert (Abb.3.26). Die durchflusszytometrische Analyse der myeloischen Vorläufer wies keine signifikanten Unterschiede in den prozentualen und absoluten Zellzahlen zwischen Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäusen und den Kontrolltieren auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch spätere Entwicklungsstadien der myeloischen Linie nach den GMP (Kap.3.3.1, Abb.3.23) Smo-unabhängig differenzieren können.

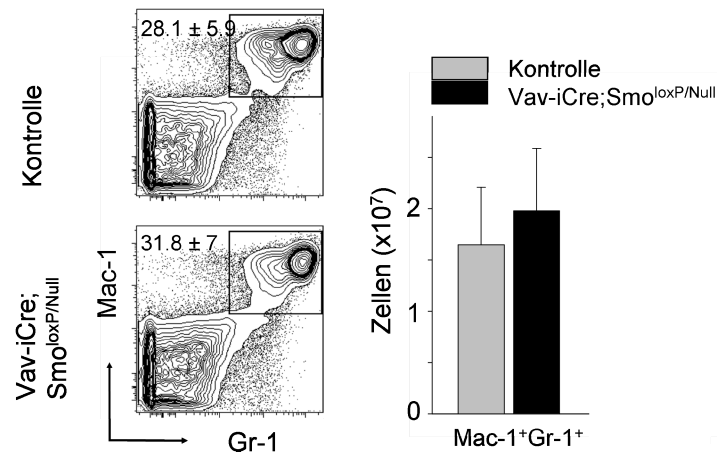


Abb.3.26: Durchflusszytometrischer Nachweis der granulo-monozytären Zellen im Knochenmark. Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) der granulo-monozytären Zellen, die mittels spezifischer Oberflächenmarker (Mac-1⁺Gr-1⁺) analysiert wurden. Die Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse und Kontrolltiere wurden im Alter von 2-6 Monaten analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen sowohl den prozentualen, als auch den absoluten Zellzahlen der Vorläufern der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- (n=6) und der Kontrolltiere (n=6) beobachtet werden ($p > 0,05$).

Einige Studien wiesen auf den Einfluss des Hh-Signalweges in der Ausreifung von Erythrozyten hin. Die Inhibition der Smo-Funktion in den hämatopoetischen Zellen ist laut Detmer *et al.* mit einer Abnahme von erythrozytären Kolonien *in vitro* assoziiert. Zudem konnte in den erythrozytären Kolonien, die sich unter der Behandlung des Smo-Inhibitors Cyclopamin ausbildeten, eine verzögerte Hämoglobinsynthese festgestellt werden (Detmer et al., 2000; Detmer et al., 2005). Um basierend auf diesen Studien die Ausreifung der erythrozytären Linie zu untersuchen, wurde die Erythropoese im Knochenmark der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- und SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Mäuse durchflusszytometrisch analysiert.

In der Erythropoese wurden die Erythrozytenvorstufen gemäß der Einteilung von Socolovsky und Liu durchflusszytometrisch identifiziert (Socolovsky et al., 2001) (Liu et al., 2006). Für diese Einteilung werden die Oberflächenantigene Ter119, das mit dem Oberflächenprotein Glykophorin A assoziiert ist, und CD71 (Transferrin-Rezeptor) zur Identifizierung der unterschiedlichen Populationen verwendet. Proerythroblasten wurden durch die geringere Expression des Ter119 von den reiferen Stadien (Ter119^{hi}) unterschieden. Die reiferen Stadien lassen sich anhand der CD71-Expression, die im Verlauf der Entwicklung eingestellt wird,

in weitere Reifestadien unterteilen. Erythrozytäre Zellen mit einer hohen Expression von Ter119 konnten anhand ihrer Größe und der Expression von CD71 in die Entwicklungsstufen A-C unterteilt werden. Der durchflusszytometrisch ermittelte Phänotyp der jeweiligen erythrozytären Vorläufer wurde anhand von May-Grünwald/Giemsa-Färbungen der Zellen validiert (Socolovsky et al., 2001). $\text{Ter119}^{\text{hi}}\text{CD71}^+\text{FSC}^{\text{hi}}$ -Zellen (Ery.A) entsprechen basophilen Zellen, $\text{Ter119}^{\text{hi}}\text{CD71}^+\text{FSC}^-$ -Zellen entsprechen chromophilen Zellen und $\text{Ter119}^{\text{hi}}\text{CD71}^-\text{FSC}^-$ -Zellen orthochromophilen Zellen. Mit Hilfe dieser beschriebenen Strategie zur Stadieneinteilung der Erythropoese mittels Durchflusszytometrie ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den prozentualen und absoluten Zellzahlen der $\text{SCL-Cre-ER}^{\text{T}};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ - bzw. $\text{Vav-iCre};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ - und den jeweiligen Kontrolltieren ermitteln (Abb.3.27).

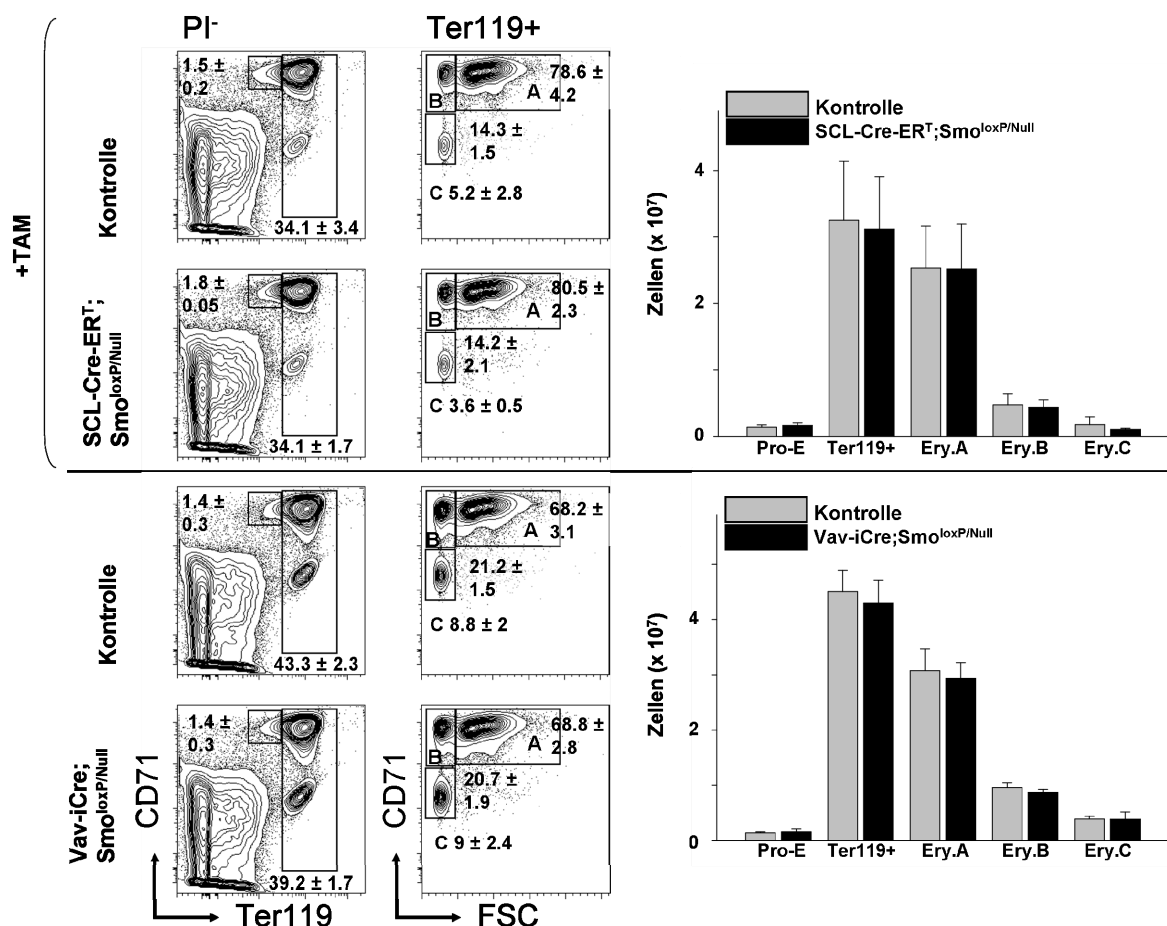


Abb.3.27: Durchflusszytometrische Analyse der Erythropoese im Knochenmark der TAM-induzierten $\text{SCL-Cre-ER}^{\text{T}};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ - und $\text{Vav-iCre};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ - Mäuse. Links: Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) der verschiedenen Zellpopulationen und ihre prozentualen Anteile. Die $\text{SCL-Cre-ER}^{\text{T}};\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$ - und die Kontrolltiere dieses Experimentes wurden 2 Wochen mit

Tamoxifen (TAM) behandelt und 5 Wochen nach TAM-Applikation im Alter von 7 Monaten analysiert. Durchflusszytometrische Nachweise von SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Tieren, die 10 Wochen mit TAM behandelt wurden und eine Woche später im Alter von 4 Monaten analysiert wurden, ergaben vergleichbare Ergebnisse. Weiterhin dargestellt ist ein exemplarischer Versuch der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere und Kontrolltiere, die in einem Alter von 5 Monaten analysiert wurden. SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}, n=3; Kontrollen, n=3; Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}, n=3; Kontrollen, n=3. Rechts: Graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der jeweiligen erythrozytären Reifungsstufen im Knochenmark der Tiere. Pro-E, Proerythroblasten (CD71⁺Ter119^{low}); Ery A-C, Erythroblasten-Klassifizierung. Sowohl die prozentualen, als auch die absoluten Zellzahlen zwischen den hämatopoetischen Smo-*knockout*- und Kontrolltieren unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

Parallel zur Durchflusszytometrie wurde die Anzahl der erythrozytären Progenitoren und deren Proliferationseigenschaften im Knochenmark der Tiere mit Hilfe von *CFC*-Assays untersucht. Hierfür wurden die Zellen des Knochenmarks in Methylzellulosemedium kultiviert, welches die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren Erythropoetin und IL-3 enthielt. Diese Zusätze unterstützen die Proliferation der hämatopoetischen Vorläufer, die die Fähigkeit besitzen zu Erythrozyten auszureifen. Die erythrozytären BFU-E-Vorläufer differenzieren zu reiferen CFU-E-Stadien heran, um schlussendlich zu reifen Erythrozyten auszudifferenzieren. In einem *CFC*-Assay werden die Koloniezahlen der CFU-Es nach 2 Tagen, die der BFU-Es nach 5 Tagen ermittelt. Die Kolonienanzahl gibt Aufschluss über die Anzahl und Proliferationseigenschaften der erythrozytären Progenitoren im Knochenmark der Tiere. Im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Menge der Erythrozytenvorläufer im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- noch der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere ermitteln (Abb.3.28). Diese Daten bestätigen die durchflusszytometrischen Untersuchungen.

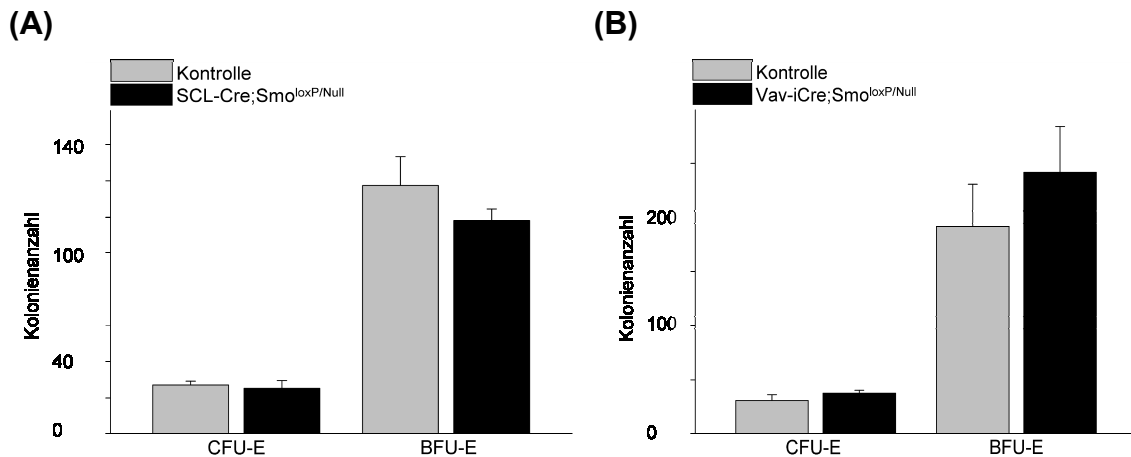


Abb.3.28: Colony-Assays von erythrozytären Progenitoren im Knochenmark. Es wurden Knochenmarkszellen von TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null} (n=3)-, von Vav-iCre;Smo^{loxP/Null} (n=3)- und jeweils drei Kontrolltieren ausgesät. Die SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und die Kontrolltiere dieses Experimentes wurden 2 Wochen mit Tamoxifen (TAM) behandelt und 5 Wochen nach TAM-Applikation im Alter von 7 Monaten analysiert. Die Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere und Kontrolltiere wurden in einem Alter von 5 Monaten analysiert. Die Koloniezahlen zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

Um zu bestätigen, dass die normale Knochenmark-Erythropoese und Koloniebildung auch mit normalen peripheren Bluterythrozytenzahlen einhergeht, wurden automatisierte Blutbilder von den SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- bzw. Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäusen erstellt. Die Anzahl der reifen Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten sowie der Hämoglobin- und der Hämatokritwerte des Blutes zeigten keine Abweichungen zur jeweiligen Wildtyp-Kontrolle (Tab.3.2).

Tab.3.2: Blutbilduntersuchung mittels VetABC der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Systeme. Die Anzahl der Lymphozyten und Erythrozyten, der Hämoglobin- und der Hämatokritwert, sowie die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut der Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zu den Kontrolltieren. Angegebene Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der untersuchten Tiere dar. Die SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- und die Kontrolltiere dieses Experimentes wurden 2 Wochen mit Tamoxifen (TAM) behandelt und 5 Wochen nach TAM-Applikation im Alter von 7 Monaten analysiert. Die Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere und Kontrolltiere wurden in einem Alter von 5 Monaten analysiert. SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}, n=3; SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Kontrolltiere, n=3; Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}, n=3; Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Kontrolltiere, n=3. WBC, engl.: *white blood cells*; RBC, engl.: *red blood cells*; HGB, Hämoglobin; HCT, engl.: *hematocrit*; PLT, engl.: *platelets*.

Parameter	Kontrolle	SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}	p-Werte	Kontrolle	Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}	p-Werte
WBC (10 ³ /mm ³)	5,5 \pm 1,25	5,83 \pm 1,09	0,75	4,67 \pm 1,79	5,67 \pm 1,67	0,47
RBC (10 ⁶ /mm ³)	9,58 \pm 0,19	9,94 \pm 0,51	0,35	9,87 \pm 0,25	10,1 \pm 0,35	0,42
HGB (g/dl)	16,16 \pm 0,57	16,06 \pm 0,57	0,84	16,13 \pm 0,72	16,43 \pm 0,66	0,62
HCT (%)	49,43 \pm 1,81	50,33 \pm 2,57	0,64	50,43 \pm 1,66	52,3 \pm 1,65	0,24
PLT (10 ³ /mm ³)	1518,3 \pm 197,4	1708,3 \pm 87,7	0,23	1179 \pm 288,3	1255 \pm 70,55	0,69

Im Gegensatz zu den Daten anderer Gruppen sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegen eine Beeinträchtigung der Entwicklung der myelo-erythrozytären Linie durch den Smo-Verlust. Die in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen, CFU-Assays und Blutbilduntersuchungen der SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}- bzw. Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse zeigten, dass die Manipulation des Hh-Signalweges durch die funktionelle Ausschaltung von Smo keinen Einfluss auf die Ausbildung von myelo-erythrozytären Zellen hat.

3.3.3 B-Zellentwicklung in Smo-defizienten Mäusen

Da mehrere Arbeiten auch für eine Rolle des Hh-Signalweges in der B-Zellentwicklung sprachen, wurde in der vorliegenden Arbeit die B-Zellentwicklung in Knochenmark und Milz unter dem Einfluss des Smo-*knockout* untersucht. Eine Studie von Sacedon *et al.* zeigte, dass das Hh-Signal B-Zellen im Keimzentrum der Lymphfollikel vor Apoptose schützt (Sacedon *et al.*, 2005). Weitere Studien wiesen darauf hin, dass der Hh-Signalweg das Überleben von malignen B-Zellen unterstützt und an der Entwicklung des multiplen Myeloms beteiligt ist (Dierks *et al.*, 2007; Peacock *et al.*, 2007).

Um den Einfluss des Hh-Signalweges auf die terminale B-Zellentwicklung zu untersuchen wurden CD19-Cre-*knockin*-Mäuse verwendet. Das Cre-Protein unter der Kontrolle des CD19-Lokus wird vornehmlich in reifen B-Lymphozyten exprimiert.

In der Entwicklung der B-Zellen wird das B-Zell-spezifische Oberflächenantigen CD19 ab dem frühen Stadium Fr. B [nach Klassifikation von Hardy; (Li *et al.*, 1996)] exprimiert. Das CD19-Protein ist Teil des erweiterten B-Zellrezeptor-Komplexes, unterstützt die B-Zellrezeptor/Antigen-Bindung und stimuliert die Signalweiterleitung in den Zellkern. Die CD19-Expression persistiert über die vollständige Entwicklung der B-Zelle bis in reife Stadien. Mit Ausnahme der Antikörper-produzierenden Plasmazelle ist der CD19-Marker auf allen B-Lymphozyten zu finden (McHeyzer-Williams *et al.*, 2000).

Um zunächst die Auswirkungen des deletierten Smo-Proteins auf die Weiterleitung des Hh-Signals zu untersuchen, wurde die Transkription ausgewählter Hh-Zielgene in Zellen des Knochenmarks und der Milz analysiert. Wie auch die RT-PCR-Analyse der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tiere erbrachte die Analyse von Milz und Knochenmark der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere keine veränderte Expression der Zielgene Gli1 und Ptch (Abb.3.29). Bei dieser Analyse ist jedoch zu berücksichtigen, dass innerhalb der B-Zellpopulation, die in etwa 20-30 % der murinen Knochenmarkzellen ausmacht, nur die reiferen Entwicklungsstadien teilweise von dem genetischen Smo-Verlust betroffen sind.

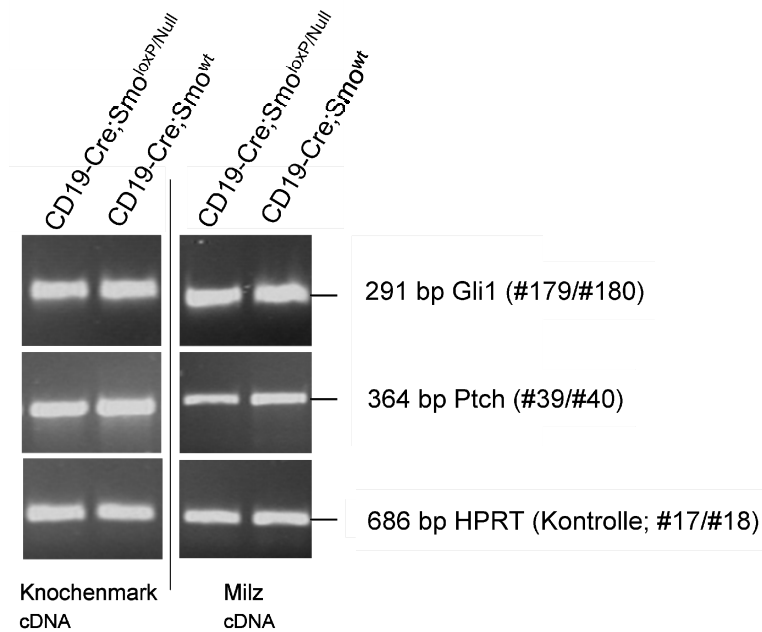


Abb.3.29: RT-PCR-Analyse der Expression der Hh-Zielgene Gli1 und Ptch aus der cDNA der Milz- und Knochenmarkzellen von CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tieren und der Kontrolltiere. Es wurden die Primer #37 und #38 für die Amplifikation der Ptch-cDNA und die Primer #179 und #180 für Gli1 verwendet. Als Kontrolle für die Qualität der cDNA wurde das PCR-Produkt eines *house keeping*-Gens (HPRT-Gen; 686 bp; Primer #17 und #18) amplifiziert. Die CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere (n=6) und Kontrolltiere (n=6) wurden in einem Alter von 4-5 Monaten analysiert.

Unter dem Einfluss des inaktivierten Hh-Signalweges wurde die vollständige B-Zellentwicklung mittels der Hardy-Klassifizierung, wie unter Kap.2.1.6 Tab.2.2 beschrieben, durchflusszytometrisch untersucht. Frühe B-Zellen im Knochenmark wurden in die unterschiedlichen Reifungsstadien A-E unterteilt. Die reifen B-Zellen, die das Knochenmark verlassen, besitzen differenzierte Oberflächenexpressionsmuster und können in follikuläre und Marginalzonen-B-Lymphozyten unterschieden werden. Abbildung 3.30 und 3.31 zeigen das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien im Knochenmark der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- und CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere und die reifen B-Zellen in der Milz im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle.

Da die Reifungsstadien A-F eine graduell steigende Rate von CD19-Cre-rekombinierten Zellen aufwiesen (Rickert et al., 1997), wurde zusätzlich der Einfluss des effizienteren Smo-*knockout* durch die Vav-iCre-Rekombinase in diesen frühen B-Zellen untersucht. Die prozentualen Anteile der unterschiedlichen

Populationen (A-F) der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse zeigten keine Unterschiede zu den Kontrolltieren.

Quantitativ konnte weder prozentual noch in Bezug auf die absoluten Zellzahlen ein signifikanter Unterschied zwischen frühen und reifen B-Lymphozyten der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

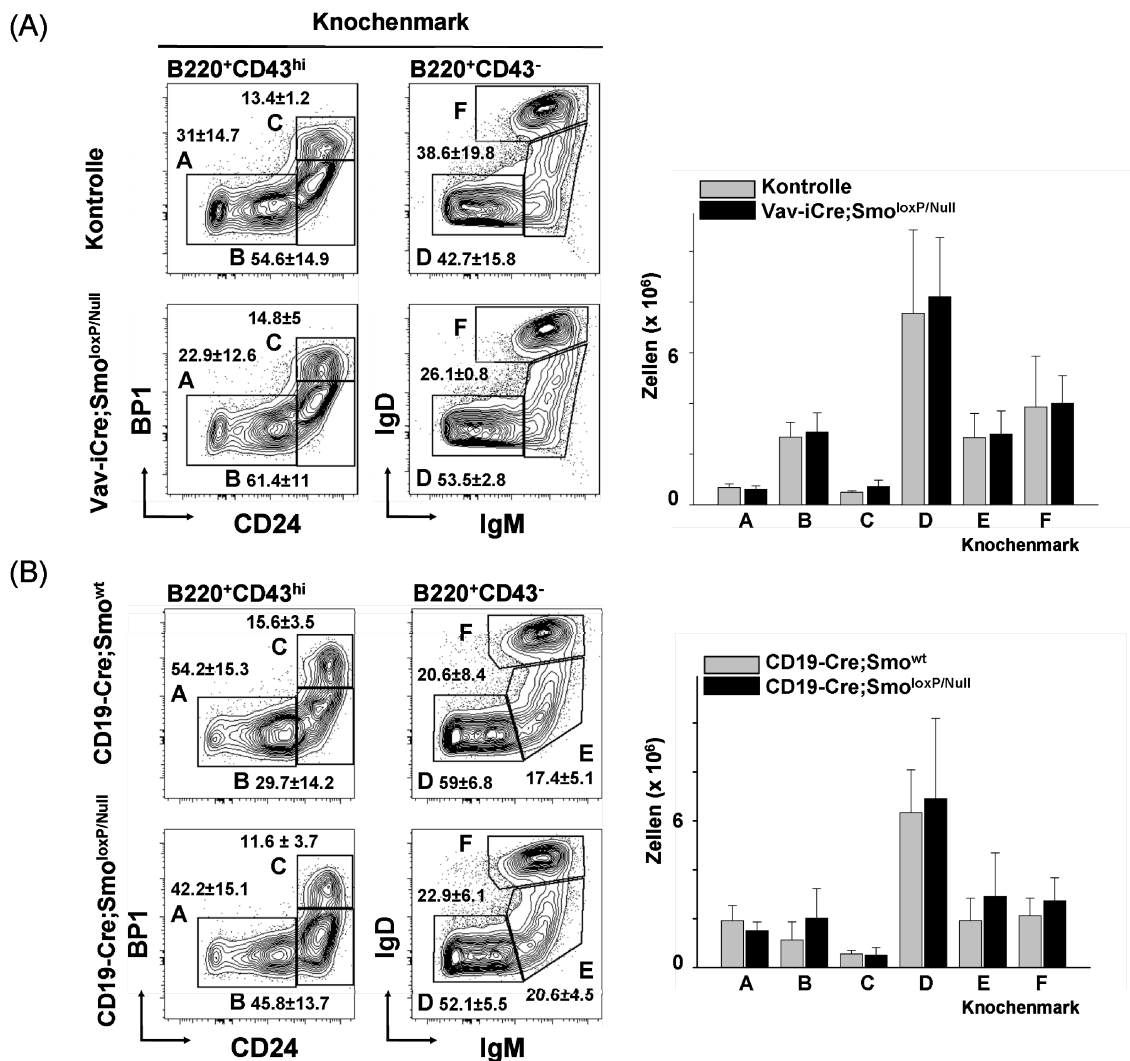


Abb.3.30: Durchflusszytometrische Analyse (FlowJo-Software) und graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der B-Zellentwicklung im Knochenmark der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- und CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere sowie der jeweiligen Kontrollen. Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse (n=4) und Kontrolltiere (n=4) wurden im Alter von 5-6 Monaten, CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse (n=9) und Kontrolltiere (n=8) im Alter von 4-5 Monaten analysiert. Reifungsstadien nach der Hardy-Klassifikation Fraktion A-F. Die prozentualen und absoluten Zellzahlen zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

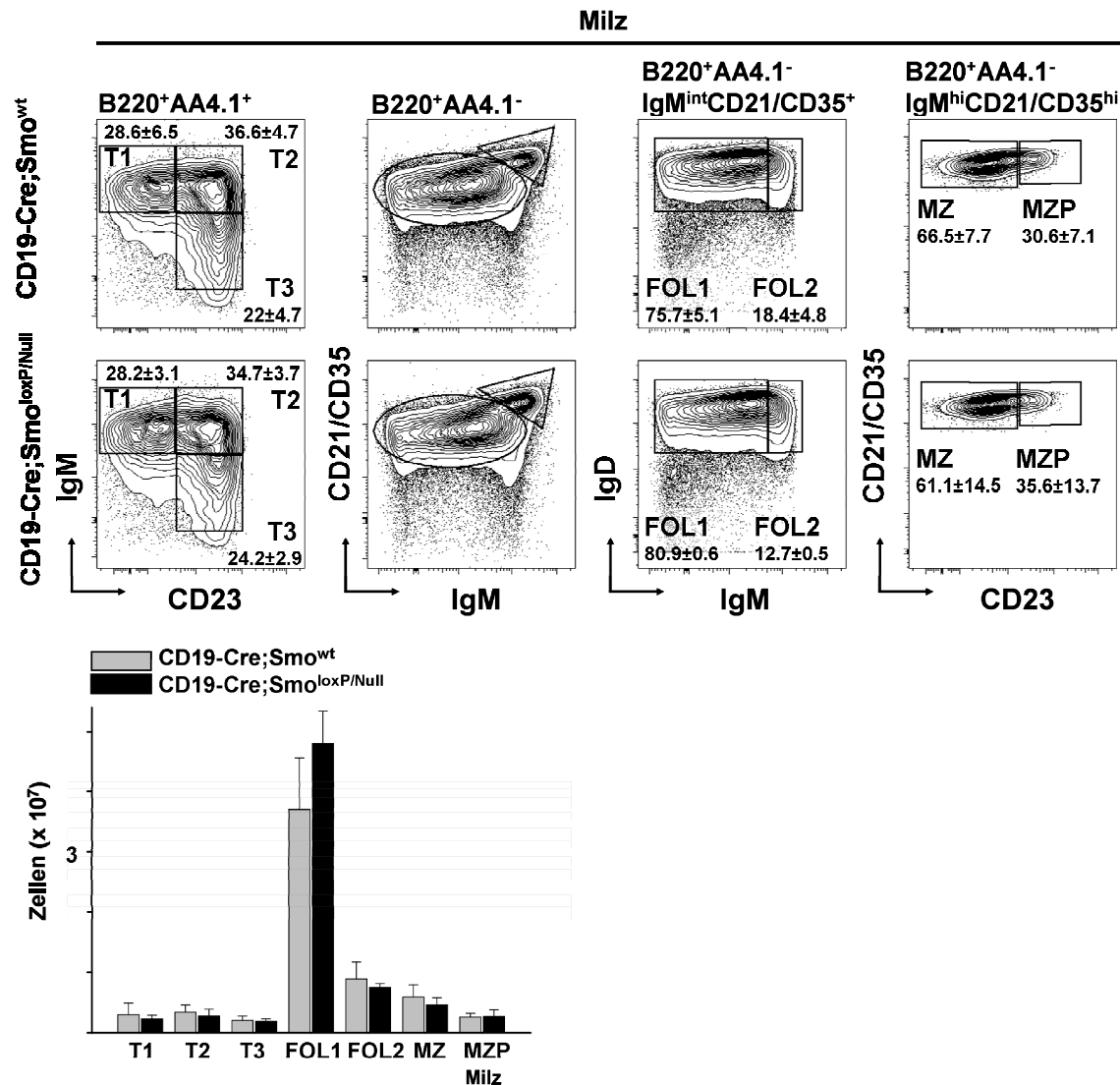


Abb.3.31: Durchflusszytometrische Analyse (FlowJo-Software) und graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der reifen B-Zellpopulationen in der Milz von CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere sowie der Kontrolltiere. CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse (n=9) und Kontrolltiere (n=8) wurden im Alter von 4-5 Monaten analysiert. T, engl.: *transitional* B-Zellen, FOL1 und 2, follikuläre B-Zellen; MZ, Marginalzonen-B-Zellen; MZP, Marginalzonen-B-Zellprogenitor. Die prozentualen und absoluten Zellzahlen zeigten keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05).

Nachdem die reifen B-Zellen das Knochenmark verlassen haben, werden sie in der Peripherie nach Antigenkontakt T-Zell-abhängig oder auch T-Zell-unabhängig aktiviert und wandern anschließend in die Lymphfollikel ein. Aus diesen aktivierten follikulären B-Zellen entstehen durch die Keimzentrumsreaktion B-Zellen, deren BCR für die Bindung an ein spezifisches Antigen optimiert wurde. Diese aktivierten ausdifferenzierten B-Zellen, die Antikörper produzieren und sezernieren, werden als Plasmazellen bezeichnet (McHeyzer-Williams et al., 2001). Die

durchflusszytometrische Detektion der Plasmazellen wurde anhand der Marker CD28 und CD138 (Syndecan-1) durchgeführt (Delogu et al., 2006). Die Kombination der beiden Antigene ist nur dann anzuwenden, wenn zuvor alle reifen T-Zellen durch ihre Marker CD4 und CD8 ausgeschlossen wurden, da CD28 als ein Molekül bekannt ist, welches normalerweise auf T-Zellen exprimiert wird und dort die Aktivierung der T-Zelle unterstützt (Schwartz, 1992).

Zum eindeutigen Nachweis des B-Zellursprungs der in der Durchflusszytometrie identifizierten Plasmazellpopulation wurde in CD19-Cre;R26^{EYFP}-Mäusen die Aktivierung des R26^{EYFP}-Allels durch das CD19-Cre-Transgen induziert. Plasmazellen, in denen das CD19-Cre-*knockin* vermutlich nicht mehr exprimiert wird, besitzen dennoch das rekombinierte R26^{EYFP}-Allel, da es im Verlauf ihrer Entwicklung Cre-vermittelt aktiviert wurde. So konnte die Population der Plasmazellen anhand dieses Zellverfolgungsansatzes durchflusszytometrisch eindeutig identifiziert werden (Abb.3.32A).

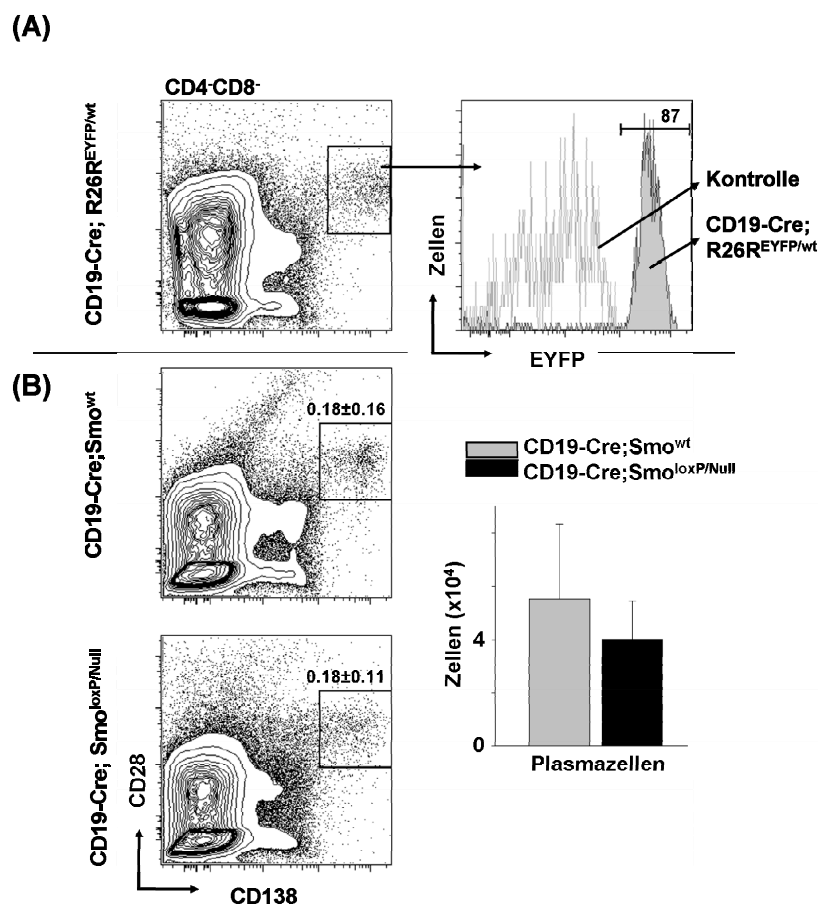


Abb.3.32: Durchflusszytometrische Analyse der Plasmazellen des Knochenmarks der CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Zur Identifikation der Plasmazellen

wurde das CD19-Cre;R26^{EYFP}-System verwendet. So konnten die Plasmazellen nicht nur anhand ihrer Oberflächenmerkmale, sondern ebenfalls anhand der CD19-Cre-vermittelten Aktivierung der Expression des fluoreszierenden Proteins detektiert werden. Die CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere (n=6) und Kontrolltiere (n=6) wurden im Alter von 4 Monaten analysiert. Die prozentualen und absoluten Zellzahlen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$).

In Bezug auf die Plasmazellanalyse konnte zwischen den CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}- und den entsprechenden Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb.3.32B). Die durchflusszytometrischen Analysen der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- und CD19-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere zeigten, dass die Inaktivierung des Hh-Signalweges keinen Einfluss auf die Größe der unterschiedlichen B-Zellpopulationen ausübt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Smo-Rezeptor weder für die Reifung der B-Zelle, noch für das Überleben der aktivierten B-Lymphozyten im Keimzentrum eine zentrale Rolle spielt.

Um zu untersuchen, ob die dreidimensionale Anordnung innerhalb der Follikel der Milz von CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}-Tieren unbeeinflusst ist, wurden HE-gefärbte Milzschnitte im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen untersucht.

Im Inneren eines Lymphfollikels bildet sich nach Antigenkontakt ein sogenanntes Keimzentrum. Hierdurch wird das Lymphfollikel zu einem Sekundärfollikel, in dessen Zentrum die B-Zellen, aktiviert durch T- und Antigen-präsentierende Zellen, eine klonale Expansion durchlaufen (Ziegner et al., 1994). Währenddessen erfolgen ein Klassenwechsel der konstanten Region des Immunglobulins und die somatische Mutation in dessen variablen Bereichen. Der B-Zellrezeptor wird auf seine Affinität zum Antigen überprüft und ungeeignete, d.h. B-Zellen mit niedrigaffinen Rezeptoren werden negativ selektiert (Shokat und Goodnow, 1995). Die Keimzentrumsreaktion resultiert zum einen in der Entwicklung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, die vor allem im Knochenmark zu finden sind (siehe Abb.3.32) und zum anderen in der Entstehung von Gedächtniszellen (McHeyzer-Williams et al., 2001).

Keimzentren sind lichtmikroskopisch sichtbar. In der Milz der CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}-Tiere konnten die Keimzentren mittels HE-Färbung der Paraffinschnitte nachgewiesen werden (Abb.3.33). Das helle Zentrum des dunklen Sekundärfollikels entsteht durch die Proliferation der aktivierten B-Zellen (Cesta,

2006). Diese Beobachtung spricht dafür, dass in der Abwesenheit des Smo-Rezeptors Keimzentrumsreaktionen in der Milz stattfinden können.

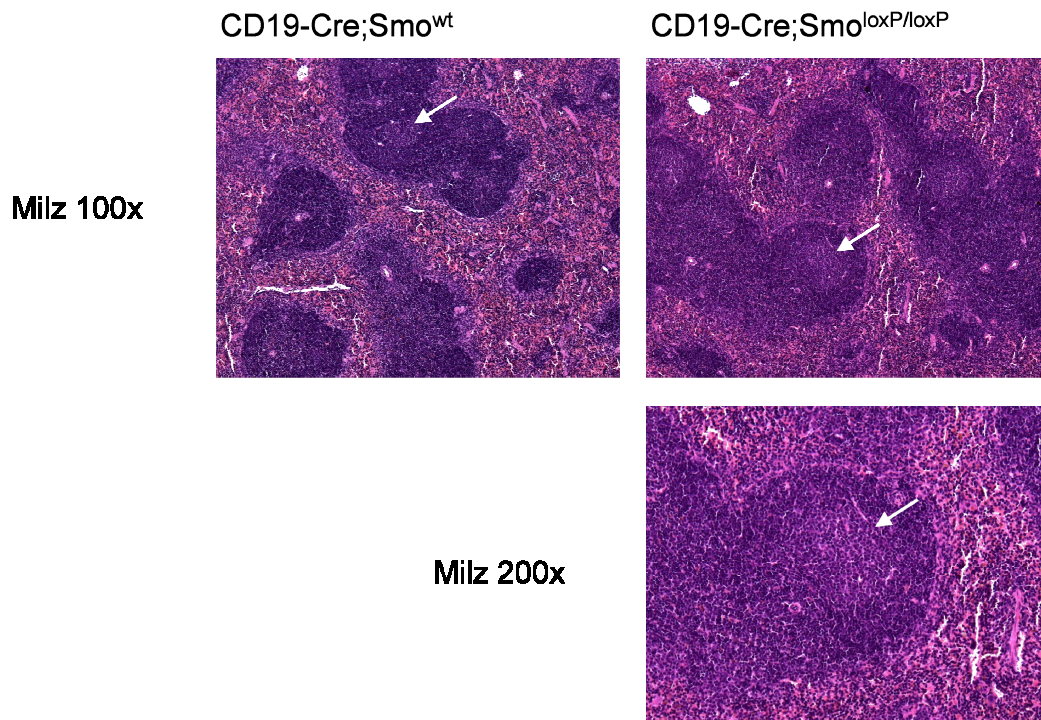


Abb.3.33: Nachweis von Sekundärfollikeln in Smo-defizienten Mäusen. Exemplarische HE-Färbung eines Milz-Paraffinschnittes einer CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}-Maus und einer Wildtyp-Kontrollmaus. Die Keimzentren (weiße Pfeile) beider Tiere wurde in 100x Vergrößerung und das der CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}-Maus zusätzlich in 200x Vergrößerung dargestellt. Die CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}-Mäuse (n=3) und Kontrolltiere (n=3) wurden im Alter von 5 Monaten analysiert.

Der Nachweis einer Keimzentrumsreaktion lässt jedoch nicht direkt auf die Funktionalität der Plasmazellen schließen. Um zu untersuchen, ob der Smo-Verlust einen Einfluss auf die Fähigkeit der Plasmazellen ausübt, Antikörper zu bilden und zu sezernieren, wurde die ELISA-Methode zum Nachweis von IgG2a verwendet. Im Blutserum der CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}- und der Kontrollmäuse konnte gleichermaßen das Immunglobulin detektiert werden (Abb.3.34).

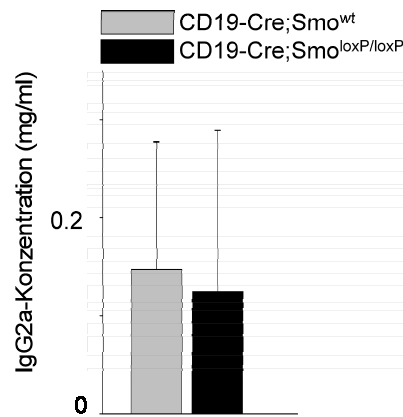


Abb.3.34: IgG2a-Nachweis mittels ELISA aus dem Blutserum von CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}- und Kontrolltieren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der IgG2a-Konzentration (mg/ml) zwischen CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}- (n=3) und Kontrolltieren (n=3) beobachtet werden ($p > 0,05$). Die CD19-Cre;Smo^{loxP/loxP}-Mäuse und Kontrolltiere wurden im Alter von 5 Monaten analysiert.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse, die Nachweise der Keimzentren in der Milz und des Immunglobulins IgG2a im Serum der transgenen Tiere, dass der Smo-Rezeptors keine zentrale Rolle in der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark spielt und auch keinen Einfluss auf die weitere Differenzierung in der Milz ausübt.

3.3.4 Inaktivierung des Hh-Signalweges in Thymozyten und in dem Thymusepithel

In früheren Arbeiten wurde die Rolle des Hh-Signalweges in der Entwicklung der T-Zellen untersucht (El Andaloussi et al., 2006). El Andaloussi *et al.* zeigte unter der Verwendung eines frühen T-Zell-spezifischen und konditionalen ubiquitären Smo-*knockout* die signifikante Reduktion der Thymozyten im Thymus. Da die Deletion des Smo Exon 1 in reiferen T-Zellen keinerlei Auswirkungen auf das T-Zellkompartiment zeigte, folgerten El Andaloussi *et al.*, dass der Hh-Signalweg die Homöostase früher T-Zellvorläufer reguliert.

Das von El Andaloussi *et al.* verwendete Mx-Cre;Smo^{loxP/Null}-System führt zu einem Smo-*knockout* vermutlich sowohl im Thymusstroma als auch in den hämatopoetischen Progenitoren der Mäuse. Um die beiden Zellkompartimente, hämatopoetische Vorläufer und Thymusstroma, getrennt voneinander zu untersuchen und den möglicherweise Hh-Signalweg-abhängigen Zelltyp des

Thymus zu eruieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei genetische Ansätze gewählt.

Das Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-System erlaubt die Deletion des Smo-Proteins in allen hämatopoetischen Zellen. Die unterschiedlichen T-Zellentwicklungsstadien wurden unter dem Einfluss des Smo-Verlustes durchflusszytometrisch untersucht. In die Untersuchung wurden die T-Zellkompartimente DP-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, sowie die vier DN-Entwicklungsstadien mit einbezogen. Für die Unterteilung der DN-Stadien wurden die Oberflächenmarker CD25 und CD44 verwendet (Zlotnik et al., 1992). Ein weiteres frühes T-Zellstadium ist der ISP-Progenitor, der CD8 und auf einem sehr niedrigen Niveau den TCR exprimiert (Abb.3.35).

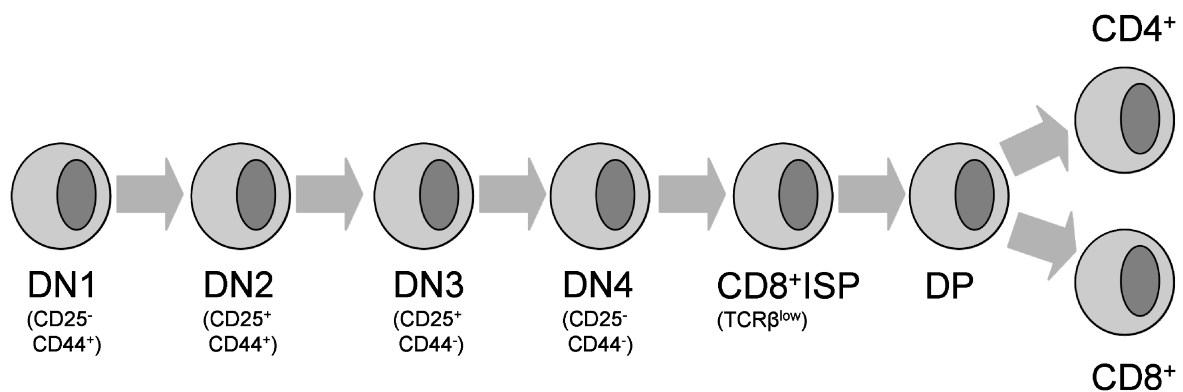


Abb.3.35: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus. Die vier DN-Entwicklungsstadien werden über die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD44 und das intermediäre ISP-Stadium wird anhand der Expression von CD8 und der sehr niedrigen Expression von TCRβ identifiziert. DP-Zellen weisen CD8 und CD4 auf ihrer Oberfläche auf, während reife T-Zellen nur einen der beiden Korezeptoren exprimieren. DN, CD4⁻CD8⁻ (doppelt negativ); ISP, engl.: *immature single positive*; DP, CD4⁺CD8⁺ (doppelt positiv).

Es zeigte sich, dass die Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse unabhängig von dem Verlust des Smo-Exon 1 (Kap.3.2) alle Stadien der Thymusentwicklung im Thymus aufwiesen. Die prozentualen und absoluten Zellzahlen der DP-, CD4-, CD8-, ISP-Zellen sowie die unterschiedlichen DN-Stadien 1-4 waren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren nicht zu unterscheiden. Dieser durchflusszytometrische Nachweis aller T-Zellkompartimente im Thymus der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse wies auf eine Smo-unabhängige Entwicklung der T-Zellen hin (Abb.3.37).

Da das Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-System den Hh-Signalweg nur in den hämatopoetischen Progenitoren und Thymozyten inaktivierte, wurde ebenfalls ein

Thymusepithel-spezifischer *Smo-knockout* untersucht. Um den Stromaeffekt, der ebenfalls für die Ergebnisse von El Andaloussi *et al.* verantwortlich sein könnte, zu untersuchen, wurde das *Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}*-System gewählt. Zudem wiesen die Ergebnisse von Siggins *et al.* auf den Stroma-assoziierten Effekt hin (Siggins *et al.*, 2009). Siggins *et al.* verwendeten ein HSC-spezifisches *Ptch-knockout*- und ein epitheliales *Ptch-knockout*-Modell. Jedoch konnte durch den Verlust des negativen Regulators *Ptch* keine Aktivierung des Hh-Signalweges in hämatopoetischen Zellen verzeichnet werden. In der Arbeit von Siggins *et al.* hatte der *Ptch*-Verlust keinen Einfluss auf die hämatopoetischen Zellen. Die epitheliale Aktivierung führte zu einer erhöhten Apoptoserate von Lymphozyten und zu einem Anstieg des Zytokins *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP).

Die Interaktion des Thymozytenprogenitors mit dem umliegenden Thymusepithel über morphogene Signalwege ist essentiell für die weitere Differenzierung des T-Zellvorläufers. Dies wird insbesondere durch die Inhibition der T-Zellentwicklung, wie sie durch eine fehlende Notch-Liganden-Expression des Thymusepithels verursacht wird, deutlich (Koch *et al.*, 2008).

Um den Einfluss des Hh-manipulierten Thymusepithels auf die T-Zellentwicklung zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit der transgene *Smo^{loxP}*-Lokus durch die *Foxn1-Cre*-Rekombinase ausgeschaltet. Das murine *forkhead box*-Protein N1, kurz *Foxn1*, wird spezifisch im Thymusepithel und Haarfollikeln exprimiert. Mutationen in der kodierenden Sequenz führen zu haarlosen Mäusen. Diese sogenannten Nacktmäuse zeichnen sich außerdem durch den funktionellen Verlust des Thymus aus, was eine Immundefizienz aufgrund der fehlenden Thymozyten zur Folge hat (Shakib *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2003). Um die Inaktivierung des Hh-Signalweges im Thymusepithel der *Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}*-Tiere funktionell nachzuweisen, wurde eine quantitative *real-time* RT-PCR der Hh-Zielgene *Ptch*, *Gli1* und *BMP4* durchgeführt. Die Expression des *Smo*-Rezeptors (Exon 2-3) wurde zur zusätzlichen Validierung des genetischen Systems untersucht. Hierfür wurde die RNA des Thymusstromas isoliert und als cDNA in die RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Die Expression des *Smo*-Transkriptes im Thymusgewebe der *Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}*-Tiere war im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle herunterregelt. Auch die Expression des Transkriptionsfaktors *Gli1* war tendenziell gegenüber der *Gli1*-Expression der Kontrolltiere erniedrigt. Da in vorangegangenen Experimenten die Expression von *Gli1* im Knochenmark mittels

der verwendeten TaqMan[®] Assays nicht zu detektieren war, wurden für die Untersuchung des Thymusepithels zwei verschiedene Gli1-Nachweise verwendet. Die spezifische Detektion der Gli1 Exone 2-3 und Exon 11-12 zeigten, dass Gli1-mRNA mit Hilfe der *real-time* RT-PCR-Analyse im Thymusstroma nachgewiesen werden kann. Die Unterschiede in den Gli1-Expressionsniveaus können sich aufgrund unterschiedlicher Primer-Effizienzen ergeben. Das Expressionsniveau von Ptch und BMP4 wurde durch den Thymusepithel-spezifischen *Smo-knockout* wie erwartet tendenziell heruntergeregt (Abb.3.36).

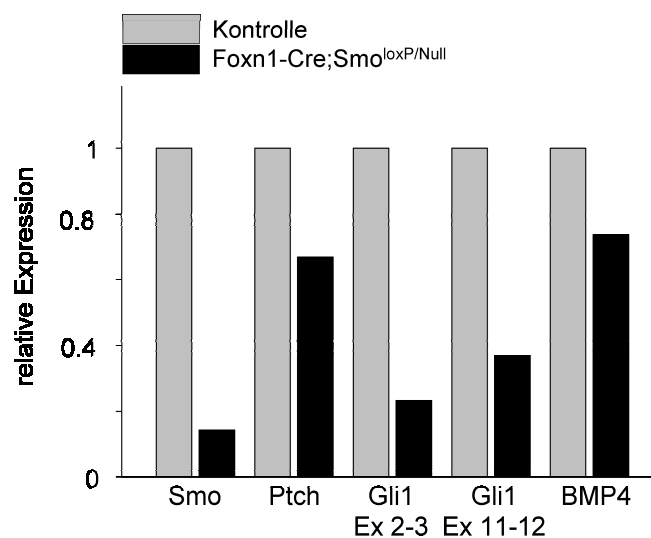


Abb.3.36: Expressionsquantifizierung der Hh-Zielgene Ptch, Gli1 und BMP4 sowie der Hh-Komponente Smo in den Zellen des Thymusstromas der Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}- und Kontrolltiere durch *real-time* RT-PCR-Analyse. Die Expression von Smo und Gli1 war tendenziell vermindert. Auch die relative Expression von BMP4 und Ptch war im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle verringert. Die Expressionsunterschiede erreichten jedoch kein Signifikanzniveau ($p > 0,05$). Die Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null} (n=3) und Kontrolltiere (n=3) wurden in einem Alter von 2 Monaten analysiert. Relative Expression in n-facher Änderung zur Kontrolle angegeben.

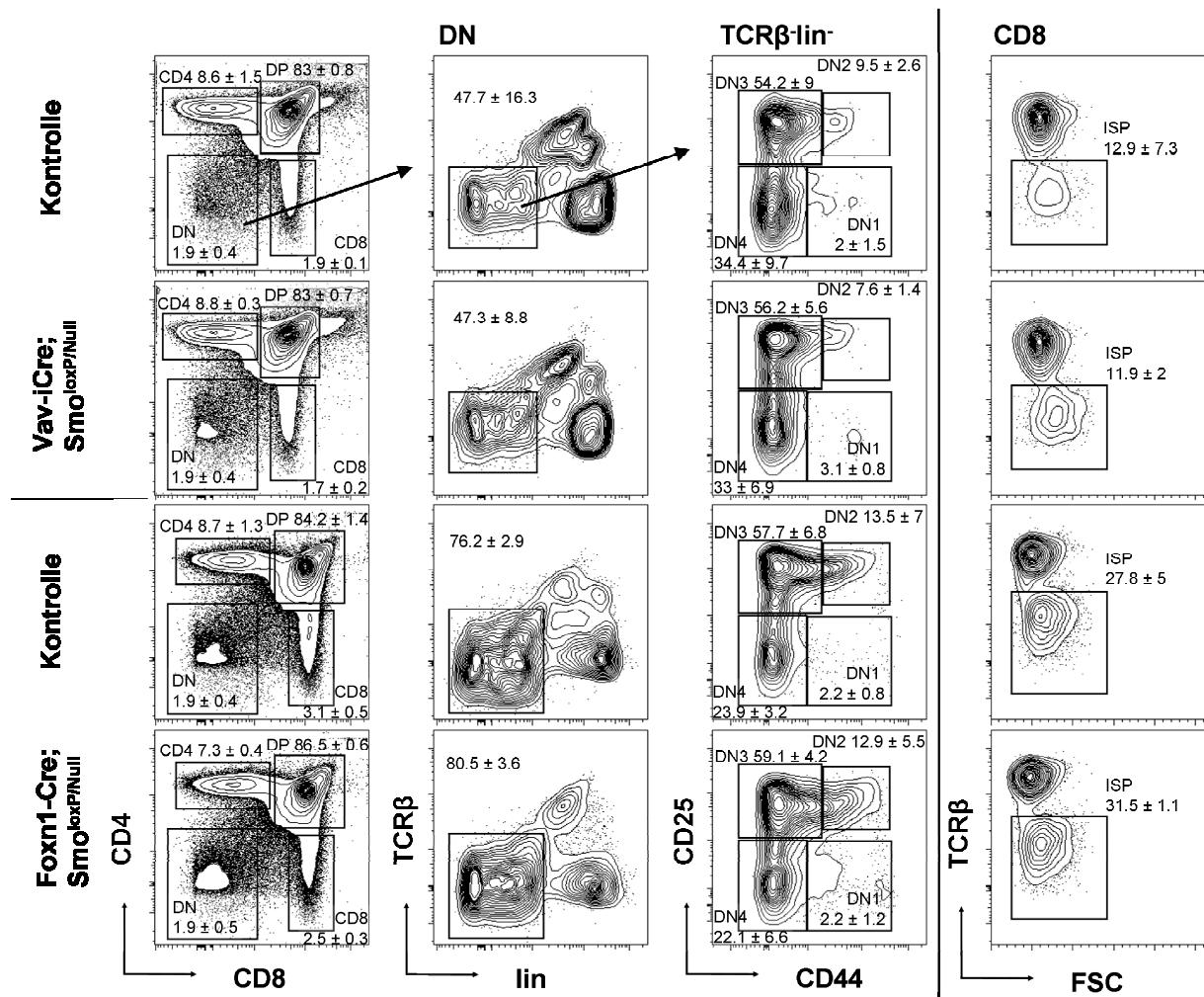
Die fehlende Signifikanz zwischen den Expressionen der *Smo-knockout*- und Wildtyp-Tiere könnte durch das Isolierungsverfahren des Thymusstromas zu erklären sein. Da das vollständige Stroma des Thymus, das neben Thymusepithelzellen auch Endothelzellen, Fibroblasten und z. B. dendritische Zellen enthält, zur Isolierung der mRNA verwendet wurde, entstammt nur ein Anteil der mRNA der Smo-defizienten Thymusepithelzellen. Die Nachweise des rekombinierten Smo^{loxP}-Allels (Kap. 3.2.1, Abb.3.13) im Thymusstroma der Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}-Tiere zeigte die Deletion des Smo-Exon 1 auf genomischer Ebene,

was auf eine erfolgreiche genetische Deletion des Smo-Rezeptors im Thymusepithel schließen lässt.

Um die Auswirkungen des Thymusepithel-spezifischen Smo-Verlustes auf die reifenden Thymozyten im Thymus zu untersuchen wurden analoge durchflusszytometrische Analysen zu den Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tieren durchgeführt. Ein Thymusepithel-spezifisches Smo-*knockout* führte ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden in den prozentualen und absoluten Zellzahlen der T-Zellkompartimente zwischen den Foxn1-Cre;Smo^{loxP/Null}-Mäusen und den Kontrolltieren (Abb.3.37).

Weder die Inaktivierung des Hh-Signalweges innerhalb sich entwickelnder T-Zellen, noch der Smo-*knockout* in Thymusepithelzellen hatten Einfluss auf die fortlaufende T-Zellentwicklung.

(A)



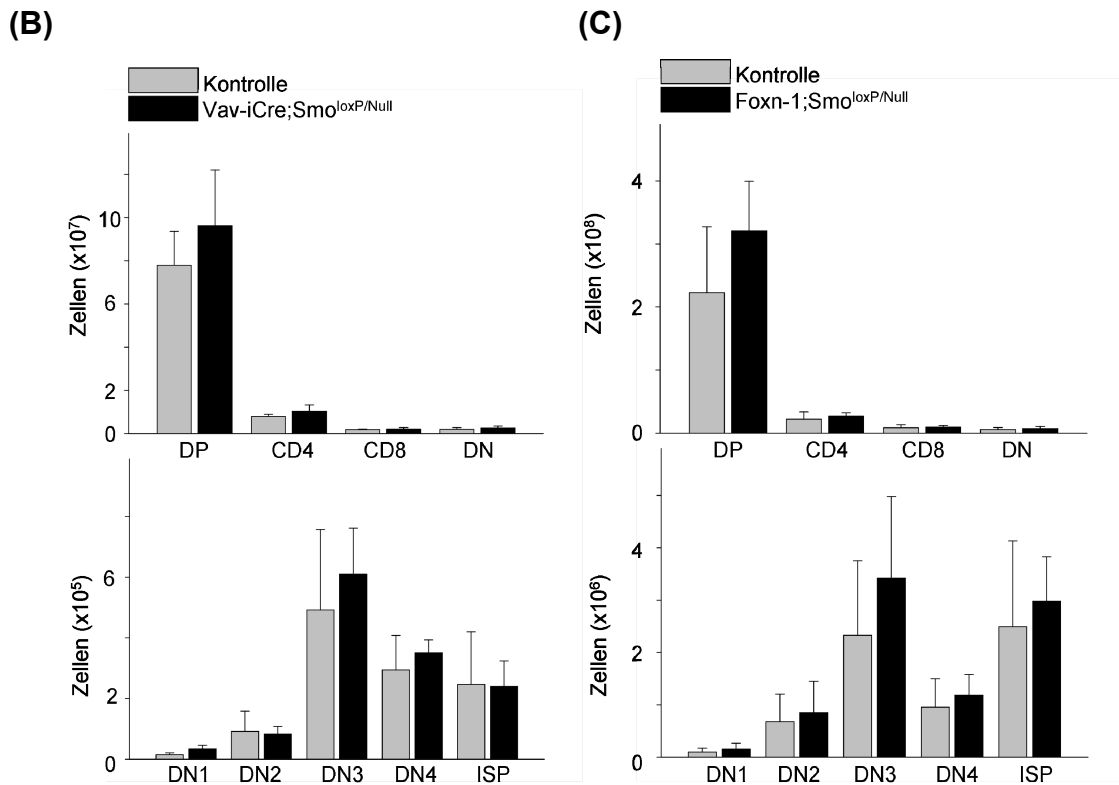


Abb.3.37: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellentwicklung unter dem Einfluss eines Hämatopoese- und Thymusepithel-spezifischen *Smo-knockout*. (A) Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo Software) der durchflusszytometrischen Analyse der *Smo*-defizienten Thymozyten im Thymus der Vav-iCre;*Smo*^{loxP/Null}-Tiere (n=3) und Kontrolltiere (n=3) im Alter von 2 Monaten und der T-Zellenentwicklungsstadien im *Smo*-defizientem Thymusepithel der Foxn1-Cre;*Smo*^{loxP/Null} (n=7)- und Kontrolltiere (n=15) im Alter von 1-4 Monaten. (B) Die absoluten Zellzahlen der Vav-iCre;*Smo*^{loxP/Null}- und (C) Foxn1-Cre;*Smo*^{loxP/Null}-Tiere im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Kontrolle wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$). Lin, Linienmix; DN, doppelt negativ; DP, doppelt positiv; ISP, engl.: *immature single positive* CD8; TCR β , engl.: *T cell receptor* β .

Zusammenfassend weisen die dargestellten Analysen der T-Zellentwicklung auf eine *Smo*-unabhängige Ausreifung dieser Zellen hin.

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten Nachweise zeigten, dass die Inaktivierung des Hh-Signalweges über den Transmembranrezeptor Smoothened keinen Einfluss auf die Anzahl, Entwicklung oder Funktion der hämatopoetischen Zellen ausübte.

3.4 Konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges innerhalb der Hämatopoese

Konditionale Smo-Aktivierung innerhalb der Hämatopoese

Das Membranprotein Smo ist eine essentielle Komponente des kanonischen Hh-Signalweges. Bei Abwesenheit des Hh-Liganden inhibiert der Rezeptor Ptch die Aktivierung von Smo und verhindert die Hh-Signaltransduktion in den Zellkern. Eine mutante Form des Smo-Rezeptors (SmoM2) ist aufgrund einer Punktmutation in der kodierenden Gensequenz unabhängig von der Repression durch Ptch. Die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges durch die Mutation des Smo-Rezeptors wurde im humanen System in Zusammenhang mit verschiedenen malignen Tumoren, wie dem Medulloblastom und Basaliom gefunden (Bonifas et al., 2001; Lupi, 2007). Um den Einfluss des Hh-Signalweges auf die Blutbildung zu untersuchen, wurde neben dem beschriebenen Smo-Funktionsverlust-Modell das SmoM2-Modell mit Smo-aktivierender Funktion verwendet.

Um die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges auf das hämatopoetische System zu untersuchen, wurden Mäuse gezüchtet, die eine Hämatopoese-spezifische Expression des mutierten Smo-Proteins SmoM2 aufwiesen. Zunächst wurde untersucht, ob die Nachkommen der Kreuzung zur Zucht einer Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Maus der Mendel'schen Regeln entsprechend geboren wurden. Damit wurde ausgeschlossen, dass die Expression des SmoM2-Rezeptors durch die Vav-iCre-vermittelte Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels *in utero* zu einer positiven bzw. negativen Selektion der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere führte (Tab.3.3).

Tab.3.3: Genotyp-Verhältnis bei der Zucht von Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäusen. Die Analyse von 5 Würfen und insgesamt 38 Tieren im Alter von 3-4 Wochen ergab das in der Tabelle dargestellte prozentuale Verhältnis und die absolute Verteilung der möglichen Genotypen. Der p-Wert wurde über den Chi-Quadrat-Anpassungstest ($\chi^2 = 1,37$; 3 d.f.) ermittelt. Die vier Genotypen entsprechen der Normalverteilung nach den Mendel'schen Regeln. n, Anzahl.

Genotyp	Vav-iCre; R26^{SmoM2}	Vav-iCre; R26^{wt}	wt; R26^{SmoM2}	wt; R26^{wt}	p-Wert
%	18,4	31,58	26,32	23,68	0,713
n	7	12	10	9	

Da keine signifikante Abweichung des Genotyp-Verhältnisses innerhalb der Nachkommen beobachtet wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Hämatopoese-spezifische SmoM2-Expression zu keiner prä- oder perinatalen Letalität führte.

In den folgenden Experimenten wurden die Genotypen Cre;R26^{wt}, wt;R26^{SmoM2} und wt;R26^{wt} als Kontrollen zusammengefasst, da nicht davon auszugehen ist, dass sich diese Genotypkonstellationen funktionell voneinander unterscheiden.

Im Rahmen der detaillierten Analyse der Organe Thymus, Milz und Knochenmark von Hämatopoese-spezifischen SmoM2-exprimierenden Tieren wurde die absolute Zellzahl der jeweiligen Organe ermittelt (Abb.3.38).

Die Zellzahlen der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse von Thymus und Milz unterschieden sich nicht von den Kontrollen. Es konnte jedoch eine signifikante Expansion der Knochenmarkzellen der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere beobachtet werden.

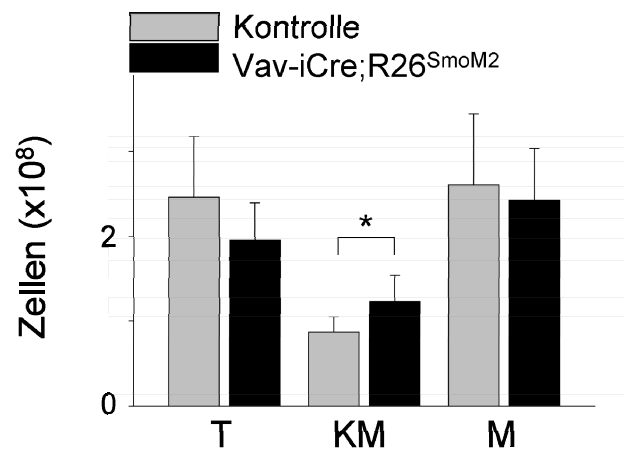


Abb.3.38: Gesamtzellzahl der Organe Thymus, Knochenmark und Milz von Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäusen und Kontrolltieren. Die Zellzahlen von Thymus und Milz zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und Kontrolltieren ($p > 0,05$). Die absolute Zellzahl des Knochenmarks der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht (*; $p = 0,016$). Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse wurden in einem Alter von 1-3 Monaten analysiert. Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere (T), $n=4$; Kontrolltiere (T), $n=4$; Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere (KM), $n=6$; Kontrolltiere (KM), $n=9$; Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere (M), $n=6$; Kontrolltiere (M), $n=8$; T, Thymus; M, Milz; KM, Knochenmark.

3.4.1 Einfluss der konstitutiven Aktivierung des Hh-Signalweges auf hämatopoetische Stammzellen und Progenitorzellen

Das hier verwendete *gain-of-function*-Modell macht sich die SmoM2-Mutante des murinen Smo-Rezeptors zunutze. In diesen genetischen Modellen wird der SmoM2-Rezeptor spezifisch im hämatopoetischen System aktiviert. Die Spezifität für das hämatopoetische System wurde wie in den Smo-Verlust-Experimenten mit Hilfe von HSC-SCL-Cre-ER^T- und Vav-iCre-transgenen Mäusen erreicht.

Die Auswirkungen der konstitutiven Aktivierung des Hh-Signalweges auf den Erhalt und die Populationsgröße der hämatopoetischen Stammzellen und multipotenten Progenitoren wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. In Kap.3.2.2 wurde bereits auf genomischer und transkriptioneller Ebene die erfolgreiche Cre-vermittelte Aktivierung des R26^{SmoM2}-Allels nachgewiesen. Zusätzlich wurde durch die Entstehung von Medulloblastomen in Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäusen der Nachweis erbracht, dass das SmoM2-Protein in den Mäusen funktionell war (Abb.3.16). Die HSC und Progenitoren der unterschiedlichen hämatopoetischen Linien im Knochenmark der Vav-

iCre;R26^{SmoM2}- und TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- Tiere wurden, wie in Kap.3.3.1 beschrieben, analysiert, und mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse zeigten, dass die prozentualen Anteile der LSK-Zellen und HSC der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren keine Unterschiede aufwiesen. Interessanterweise ließ sich sowohl im SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-System als auch im Vav-iCre;R26^{SmoM2}-System ein Trend in Richtung einer expandierten LSK-Population beobachten. Die berechneten absoluten hämatopoetischen Stammzell- und multipotenten Vorläufer-Zahlen von Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren ergaben keine signifikanten Unterschiede (Abb.3.39). Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass die SmoM2-vermittelte Aktivierung des Hh-Signalweges keinen Einfluss auf den Erhalt von hämatopoetischen Stammzellen und Progenitoren hatte.

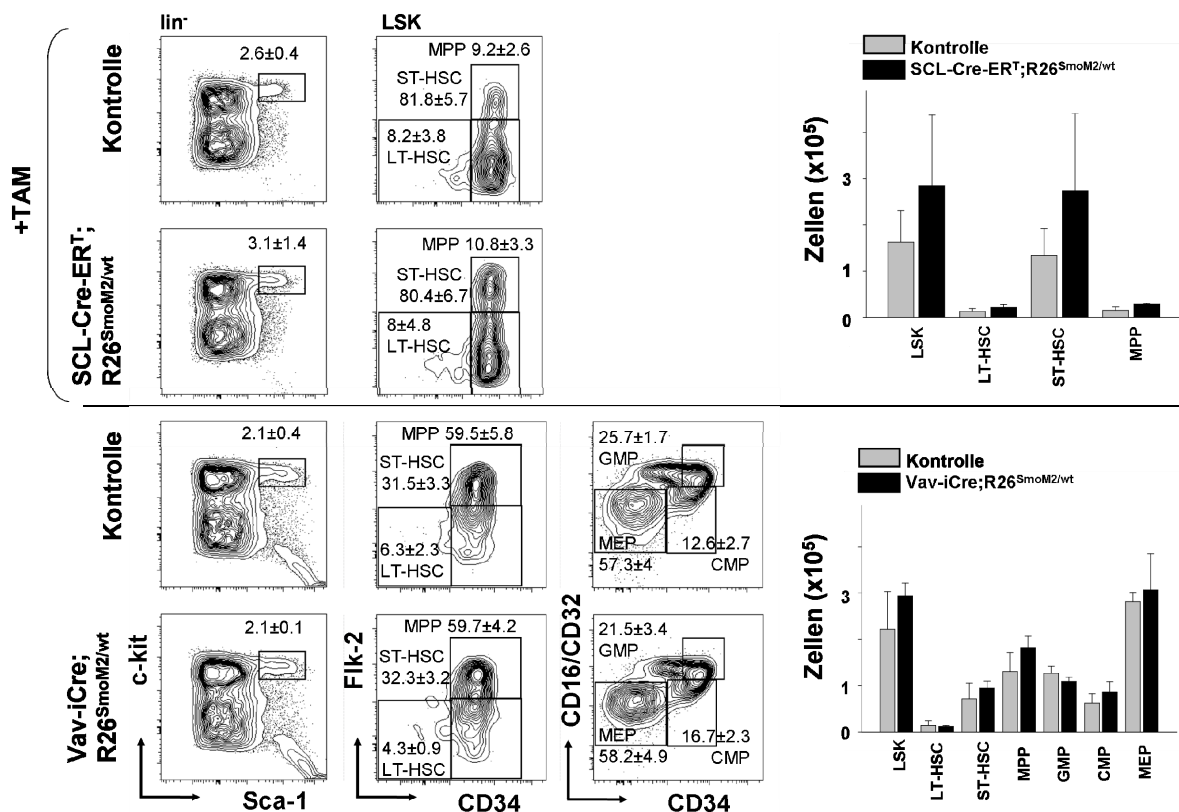


Abb.3.39: Durchflusszytometrische Analyse der HSC, GMP, CMP und MEP im Knochenmark der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse. Links: Kontur-Plot-Darstellungen (FlowJo-Software) der verschiedenen Zellpopulationen und ihre prozentualen Anteile der zuvor eingegrenzten Population sowie rechts die graphische Darstellung der absoluten

Zellzahlen ($p > 0,05$). Die SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Mäuse und Kontrolltiere wurden 3 Monate mit TAM behandelt und 4-6 Monate nach der Behandlung im Alter von 9-10 Monaten analysiert. Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere wurden im Alter von 1-3 Monaten analysiert. SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere, $n=5$; Kontrolltiere, $n=7$; Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere, $n=6$; Kontrolltiere, $n=9$. Die angegebenen Zahlen ergeben sich aus dem prozentualen Anteil (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Zellen bezogen auf die zuvor eingegrenzte Population.

Wenn die Aktivierung des SmoM2-Rezeptors innerhalb hämatopoetischer Zellen einen positiven Effekt auf den Hh-Signalweg ausübt, könnte dieser Effekt zu einer gesteigerten Expression von bekannten Hh-Zielgenen wie Gli1 und Ptch führen. Die Expression der Zielgene Gli1 und Ptch wurde daher mittels RT-PCR-Expressionsanalysen aus der cDNA der Knochenmarkszellen der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Mäuse nachgewiesen. Die Analyse der angeführten Transkripte ergab im konventionellen Agarosegel keine offensichtlichen Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (Abb.3.40).

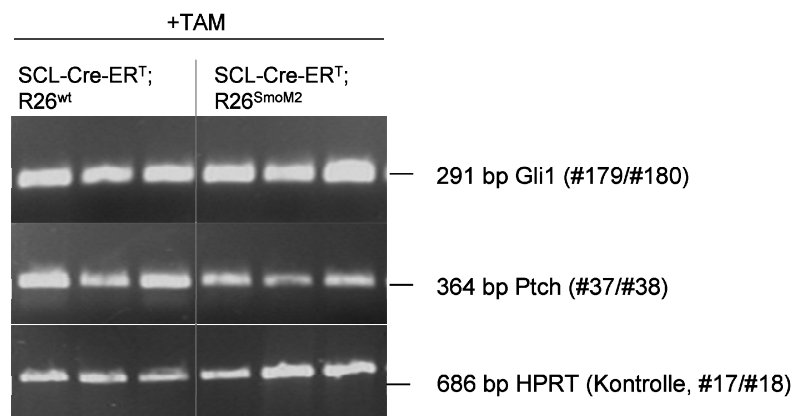


Abb.3.40: Expressionsnachweis durch RT-PCR-Analyse der Hh-Zielgene Ptch und Gli1 im Knochenmark der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere und Kontrolltiere. Die SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Mäuse ($n=3$) und Kontrolltiere ($n=3$) wurden 3 Monate mit TAM behandelt und 4-6 Monate nach der Behandlung im Alter von 9-10 Monaten analysiert. Die Abbildung zeigt den Nachweis der Gli1- (291 bp) und Ptch-Transkripte (364 bp) sowie die Expression einer Teilsequenz eines *house keeping*-Gens (HPRT-Gen; 686 bp; Primer #17 und #18). Es wurden die Primer #37 und #38 für die Amplifikation der Ptch-cDNA und die Primer #179 und #180 für Gli1 verwendet.

Mit Hilfe einer quantitativen *real-time* RT-PCR-Analyse konnten jedoch tendenzielle und signifikante Unterschiede der Expressionen dieser Gene zwischen den experimentellen Gruppen der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere und den jeweiligen Kontrollgruppen beobachtet werden.

Insbesondere fand sich ein Trend in Richtung einer erhöhten Smo-Expression in den SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tieren und eine signifikante Zunahme der Smo-Expression in den Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tieren. Die Oligonukleotide des verwendeten TaqMan[®] Assays waren nicht spezifisch für die SmoM2-Mutation. Der verwendete TaqMan[®] Assay amplifiziert sowohl Wildtyp-Smo als auch SmoM2. Das Produkt dieses Assays resultierte demnach aus der Amplifikation der Wildtyp- und der transgenen SmoM2-Sequenz. In den Zellen des Knochenmarks der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere konnte eine signifikant erhöhte Expression der Smo-mRNA nachgewiesen werden, die Expression der Zielgene Ptch und BMP4 (Chen et al., 1997) blieb jedoch unbeeinflusst (Abb.3.41).

Auch im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere konnte eine tendenziell erhöhte Smo-Transkription sowie eine erhöhte Expression des Zielgens BMP4 verzeichnet werden. Die Amplifikation von Gli1-3 war in beiden genetischen Systemen mit den verwendeten TaqMan[®] Assays nicht möglich. Wie unter Kap.3.3.1 beschrieben könnte die fehlende Amplifikation der Gli-Transkripte in der Verwendung von unterschiedlichen Primerkombinationen der beiden RT-PCR-Analysen begründet sein. Eine zusätzliche Erklärungsmöglichkeit ist die Instabilität oder geringe Halbwertszeit der Gli-mRNA, so dass eine Detektion mittels RT-PCR-Analyse nicht möglich ist (Noubissi et al., 2009).

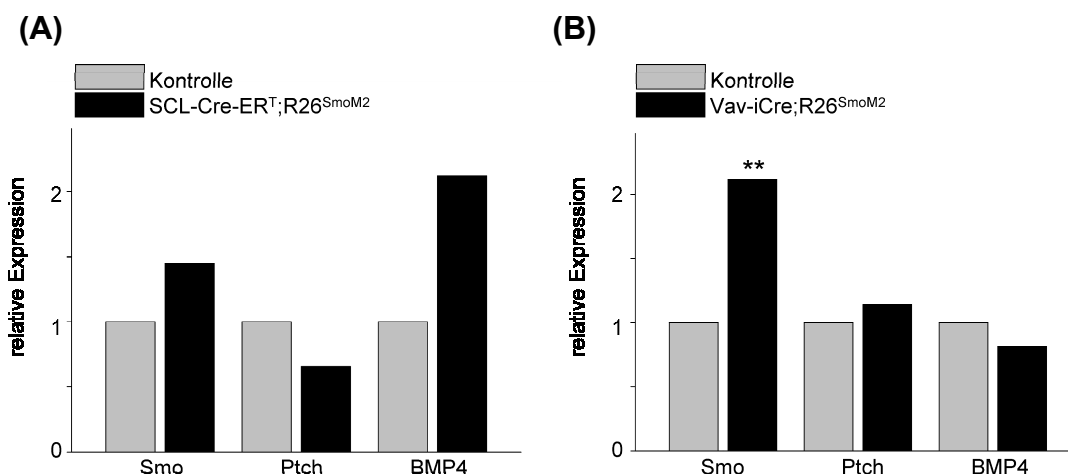


Abb.3.41: Expressionsquantifizierung der Hh-Zielgene Ptch und BMP4 sowie der Hh-Komponente Smo in den Zellen des Knochenmarks der TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere durch *real-time* RT-PCR-Analyse. Die Expression von Smo war bei den SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tieren (n=4) tendenziell im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle erhöht und erreichte bei den Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tieren (n=7) ein Signifikanzniveau von

**p = 0,0011. Die Ptch-Expression blieb in beiden experimentellen Ansätzen unverändert. Die Expression von BMP4 im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Mäuse war erhöht, jedoch nicht signifikant (p > 0,05). Die SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere wurden 3 Monate mit TAM behandelt und 4-6 Monate nach der Behandlung im Alter von 9-10 Monaten analysiert. Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere wurden in einem Alter von 2 Monaten analysiert. Die Kontrolle (Expression der Kontrolltiere) wird bei dieser Methode mit der relativen Expression gleich eins gesetzt. Relative Expression in n-facher Änderung zur Kontrolle angegeben.

Zusammenfassend zeigen die RT-PCR-Ergebnisse einen geringen Einfluss der SmoM2-Expression auf die Expression der Hh-Zielgene im Knochenmark der Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und TAM-induzierten SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere. Trotz der Expression des SmoM2-Rezeptors scheint der Hh-Signalweg in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks nicht aktiviert worden zu sein.

3.4.2 Einfluss der SmoM2-Expression auf die terminale Ausreifung hämatopoetischer Linien

Wie unter Kap.3.3.2 beschrieben, konnte im hier verwendeten Smo-Verlust-Modell keine Veränderung der Populationsgrößen der myeloischen und lymphozytären Zellen gefunden werden.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des Hh-Signalweges zu einer Veränderung des myeloischen Zellkompartiments führt, wurden die granulo-monozytären Vorläufer, Megakaryozyten (Abb.3.42) sowie die Erythrozyten (Abb.3.43) durchflusszytometrisch im Knochenmark der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere untersucht. Zusätzlich wurde die lymphozytäre Zellpopulation der Natürlichen-Killer (NK)-Zellen mit Hilfe des spezifischen Oberflächenmarkers Nk1.1 durchflusszytometrisch bestimmt.

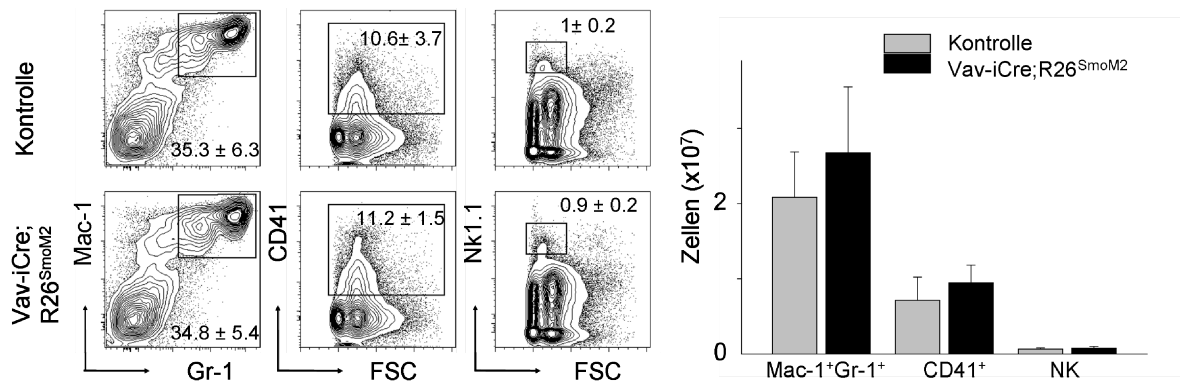


Abb.3.42: Durchflusszytometrische Analyse der granulo-monozytären Vorläufer und Megakaryozyten sowie NK-Zellen. Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) der granulo-monozytären Vorläufer, die mittels spezifischer Oberflächenmarker (Mac-1⁺Gr-1⁺) analysiert wurden. NK-Zellen und Megakaryozyten wurden anhand der Oberflächenmoleküle Nk1.1 und CD41 identifiziert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den prozentualen, als auch den absoluten Zellzahlen der unterschiedlichen Populationen der Vav-iCre;R26^{SmoM2}- (n=8) und Kontrolltiere (n=8) ermittelt werden ($p > 0,05$). Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und Kontrolltiere wurden im Alter von 2 Monaten analysiert. NK, natürliche Killerzellen.

Die prozentualen Anteile und absoluten Zellzahlen der untersuchten granulo-monozytären Vorläufer, NK-Zellen und Megakaryozyten der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere wiesen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Hämatopoese-spezifische Expression des SmoM2-Rezeptors zeigte demnach keine Auswirkung auf die Populationsgröße dieser Zellkompartimente.

Die Definition der unterschiedlichen erythrozytären Vorstufen wurde gemäß der in Kap.3.3.2 beschriebenen Klassifikation vorgenommen (Liu et al., 2006; Socolovsky et al., 2001). In den experimentellen Modellen, d.h. in den Zellen des Knochenmarks der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere zeigte sich eine erhöhte Anzahl von Erythrozyten. Das Knochenmark der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere wies eine erhöhte Frequenz von Pro-Erythroblasten (Ter119^{int}CD71⁺) und von frühen erythrozytären Zellen (Ter119^{hi}CD71⁺FSC^{low}; Ery.B) auf. Im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere konnte eine erhöhte Anzahl an Ter119⁺ erythrozytären Zellen und die von diesen Zellen abgeleitete Subpopulation der reifen Ter119^{hi}CD71⁺FSC^{low} Erythrozyten, die kleiner sind und die Expression des Transferrin-Rezeptors herunterreguliert haben, detektiert werden. Zudem konnte unabhängig vom spezifischen Reifestadium beobachtet werden, dass die Zahl der Erythrozyten tendenziell im Knochenmark der SmoM2-exprimierenden Tiere erhöht war. Diese Ergebnisse der

durchflusszytometrischen Analysen wiesen auf einen Einfluss des gesteigerten Hh-Signalweges auf die Erythropoese hin.

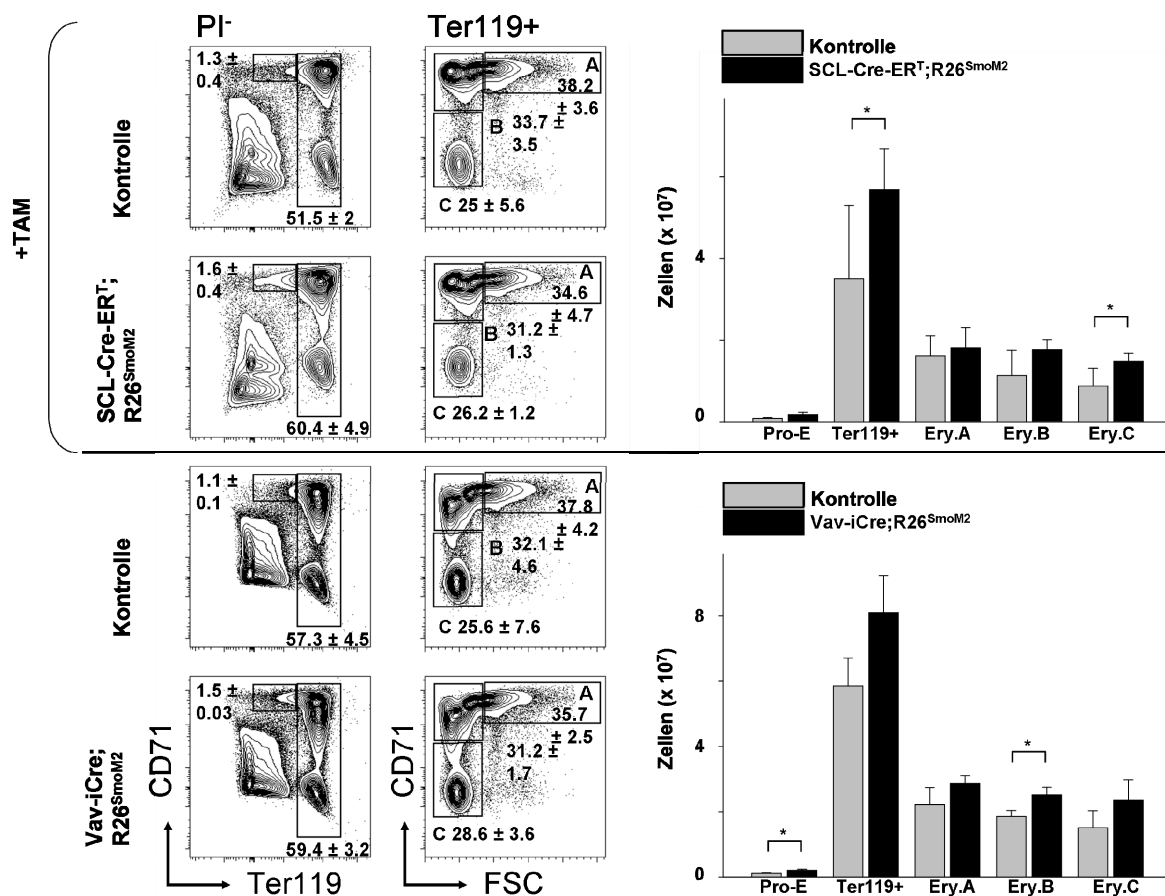


Abb.3.43: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen Erythrozyten im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse. Links: Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) der verschiedenen Zellpopulationen und ihre prozentualen Anteile der zuvor eingegrenzten Population. Die SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere wurden 3 Monate mit TAM-behandelt und 4-6 Monate nach TAM-Induktion im Alter von 9-10 Monaten analysiert. Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere wurden in einem Alter von 2 Monaten analysiert. Die SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere, n=4 und Kontrolltiere, n=6; Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere, n=8 und Kontrolltiere, n=8. Rechts: Graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der Populationen im Knochenmark der Tiere. Pro-E, Proerythroblasten (CD71⁺Ter119^{low}); Ery A-C, Erythroblasten-Klassifizierung; Signifikanz, *p < 0,05.

Mit Hilfe von CFC-Assays konnten die funktionellen Differenzierungs- und Proliferationseigenschaften der frühen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark der SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}- und der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere untersucht werden. Die Zellen wurden in einer Kombination aus den Zusätzen und

Wachstumsfaktoren FBS (engl.: *fetal bovine serum*), BSA (engl.: *bovine serum albumin*), rh Insulin, humanes Transferrin, 2-Mercaptoethanol, L-Glutamine, rm SCF (engl.: *stem cell factor*), rm IL-3 und rh IL-6 sowie rh Erythropoietin kultiviert, die die Koloniebildung der Vorläufer von Granulozyten (CFU-G), Makrophagen (CFU-M) und Erythrozyten (BFU-E) förderten. Jedoch konnte kein Effekt auf die Eigenschaften der Progenitoren der transgenen Tiere durch den konstitutiv aktivierten Hh-Signalweg gezeigt werden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die Anzahl der Kolonienzahlen nicht verändert (Abb.3.44). In der durchflusszytometrischen Analyse sind die koloniebildenden CFU-E-Zellen vor allem in der CD71^{hi}Ter119⁻ Fraktion angereichert (Terszowski et al., 2005). Dies bedeutet, dass die SmoM2-vermittelte Expansion der Erythropoese wahrscheinlich nach den Entwicklungsstadien der BFU-E/CFU-E auf der Entwicklungsstufe der Proerythroblasten (Ter119^{int}CD71⁺) verursacht wird.

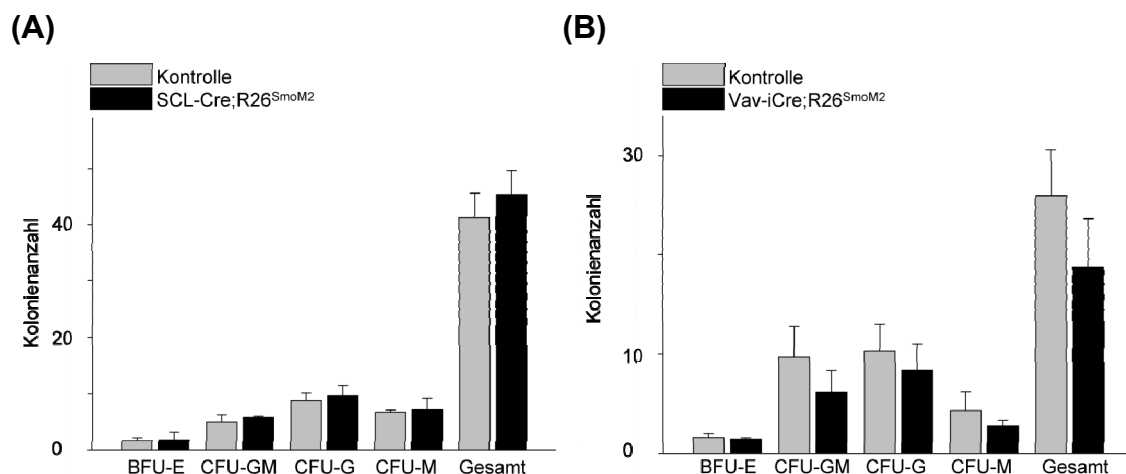


Abb.3.44: Colony-Assay-Analyse. Nachweis von myeloischen Progenitoren im Knochenmark der (A) SCL-Cre;R26^{SmoM2}- (n=3), (B) Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse (n=3) und von jeweils drei Kontrolltieren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen ermittelt werden ($p > 0,05$). Die SCL-Cre-ER^T;R26^{SmoM2}-Tiere wurden 3 Monate mit TAM-behandelt und 6 Monate nach TAM-Induktion im Alter von 10 Monaten analysiert. Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere wurden in einem Alter von 2 Monaten analysiert. BFU-E, engl.: *burst forming unit-erythroid*; CFU-GM, engl.: *colony forming unit-granulocyte/macrophage*.

Die Expansion der Erythroblasten im Knochenmark der experimentellen Tiere sollte sich erwartungsgemäß in der Expansion reifer Erythrozyten im peripheren Blut der Mäuse widerspiegeln. Um dies zu untersuchen, wurde den Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tieren Blut entnommen und die Anzahl der verschiedenen Zellen

und der Hämoglobin- und Hämatokritwerte mittels vollautomatisierter (VetABC-Gerät) Blutbilder analysiert.

Entgegen der Erwartung wiesen die Analysen der Erythrozytenanzahl, des Hämatokrit- und Hämoglobinwertes im Blut der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere sowie die Anzahl derer Lymphozyten und Thrombozyten keine signifikanten Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle auf (Tab.3.4). Es war jedoch eine tendenzielle Erhöhung aller Erythrozyten-assoziierten Werte zu beobachten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die frühen Kolonie-bildenden erythrozytären Vorläufer durch die konstitutive Smo-Aktivierung nicht beeinträchtigt wurden. Jedoch schienen reifere Progenitoren (CD71⁺Ter119⁺) innerhalb des Knochenmarks durch die Smo-Aktivierung zu expandieren. Die Expansion schlägt sich dennoch nicht in den Erythrozytenparametern des peripheren Blutes nieder.

Tab.3.4: Blutbilduntersuchung durch VetABC-Analyse der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse. Die Anzahl der Lymphozyten und Erythrozyten, der Hämoglobin- und der Hämatokritwert sowie die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut der Tiere im Alter von 2 Monaten zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$) zu den Kontrollen. Angegebene Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der verschiedenen Parameter der untersuchten Tiere dar. Vav-iCre;R26^{SmoM2}, n=3; Kontrollen, n=3. WBC, engl.: *white blood cells*; RBC, engl.: *red blood cells*; HGB, Hämoglobin; HCT, engl.: *hematocrit*; PLT, engl.: *platelets*.

Parameter	Kontrolle	Vav-iCre; R26^{SmoM2}	p-Werte
WBC (10 ³ /mm ³)	8,1 \pm 4,61	5,22 \pm 3,2	0,42
RBC (10 ⁶ /mm ³)	7,16 \pm 2,94	7,93 \pm 3,3	0,76
HGB (g/dl)	11,17 \pm 4,6	12,75 \pm 5,03	0,68
HCT (%)	38,17 \pm 15,82	42,67 \pm 18,51	0,74
PLT (10 ³ /mm ³)	315,3 \pm 274,3	229,5 \pm 319,1	0,72

3.4.3 Konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges in der Entwicklung der B-Lymphozyten

Einfluss der konstitutiven Aktivierung des Hh-Signalweges im embryonalen Knochenmark auf die B-Lymphopoese

Der Hh-Signalweg spielt während der embryonalen Entwicklung eine zentrale Rolle. Die Ausbildung der Extremitäten, die Ossifikation und die Bildung des Neuralrohrs sind abhängig von Hh-Liganden. Innerhalb des Knochens wird Ihh vor allem in sich entwickelnden Knorpelzellen (Chondrozyten) exprimiert (Koziel et al., 2004). Das Knochenmark der Hohlknochen ist im erwachsenen Organismus Sitz des blutbildenden Systems. Ab Tag E17,5 wandern murine LT-HSC aus der fötalen Leber in den Knochen ein. Zum gleichen Zeitpunkt lassen sich bereits die ersten B220⁺IgM⁺ B-Zellen im Knochenmark der Embryonen nachweisen (Delassus et al., 1998). Die Arbeiten anderer Gruppen konnten zeigen, dass die endochondrale Ossifikation des Knochens während der Embryogenese für die Ausbildung der hämatopoetischen Stammzellnische benötigt wird (Chan et al., 2009). Die sich entwickelnde HSC-Nische besteht aus Stromazellen, zu denen Osteoprogenitoren und Chondrozyten zählen. Besonders die Entwicklung der B-Zellen ist abhängig von der Interaktion mit Knochenzellen (Zhu et al., 2007). Osteoblasten exprimieren Faktoren, die die B-Zellentwicklung unterstützen. Der Verlust von Osteoblasten führt zur gravierenden Reduktion der B-Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen. Die Interaktion mit knochenbildenden Zellen stellt somit auch eine wichtige Komponente in der Entwicklung der B-Zellen dar (Tokoyoda et al., 2004; Wu et al., 2008). Im adulten Organismus zeigte sich, dass das Hh-Signal protektive Funktionen bezüglich des Überlebens von B-Lymphozyten ausübt (Sacedon et al., 2005). Zudem fungiert das Hh-Signal als Überlebensfaktor für maligne Zellen B-lymphozytären Ursprungs (Dierks et al., 2007; Peacock et al., 2007).

Um den Einfluss des aktivierten Hh-Signalweges auf die Entwicklung der B-Zellen zu untersuchen, wurden zwei separate experimentelle Ansätze gewählt. Der extrinsische Einfluss des im Knochenmarkstroma überexprimierten Ihh-Liganden auf die Stammzelle und die reifende B-Zelle wurde mit Hilfe des Col2-Gal4;UAS-

Ihh-Systems untersucht (Long et al., 2001). Um die Auswirkungen des konstitutiv überexprimierten Ihh-Liganden des Huhns (clhh) in Chondrozyten auf benachbarte B-Zellen des embryonalen Knochenmarks zu untersuchen, wurden die Zellen des embryonalen Knochenmarks, der fötalen Leber und Milz durchflusszytometrisch analysiert. Die Col2-Gal4;UAS-Ihh-Tiere sind *postnatal* letal, da die Überexpression des Hh-Liganden zu Fehlbildungen in der skelettalen Entwicklung führt. Demnach erfolgte die Analyse der Tiere an Tag E18,5 *in utero*. Die Defekte der Knochen waren zum Zeitpunkt an Tag E18,5 ersichtlich, so dass eine Genotypisierung der Tiere anhand ihrer Morphologie erfolgte (Abb.3.45B).

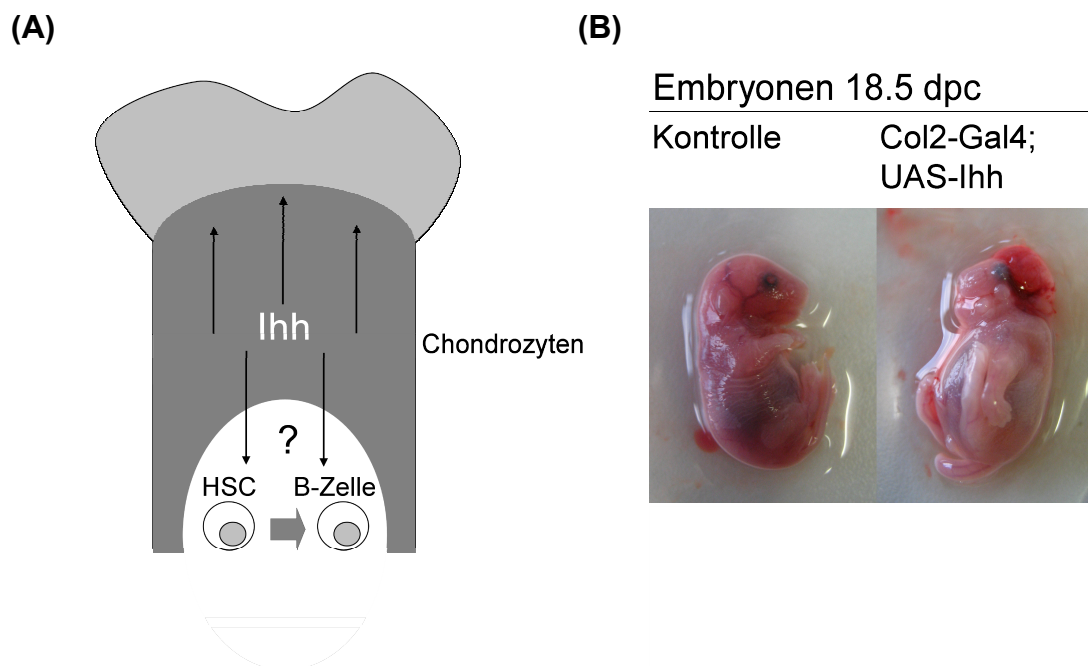


Abb.3.45: Das Col2-Gal4;UAS-Ihh-System. (A) Schematische Darstellung eines embryonalen Col2-Gal4;UAS-Ihh-Knochens. Die Chondrozyten (dunkelgraue Zone) überexprimieren Ihh (schwarze Pfeile), was Einfluss auf die hämatopoetische Stammzellnische bzw. B-Zellen im Knochenmark haben könnte (grauer Pfeil, Entwicklungsrichtung). (B) Exemplarische Abbildung eines Col2-Gal4;UAS-Ihh- (n=6) und Kontrollembryonen (n=10) nach der Präparation aus dem Uterus des Muttertiers an Tag E18,5. Die Col2-Gal4;UAS-Ihh-Embryonen wiesen, wie erwartet, starke Defekte in der Entwicklung der Knochen auf.

Die unreifen B-Zellprogenitoren wurden über die Hardy-Klassifizierung in drei Entwicklungsgrade (Fraktion A-C) eingeteilt. Der jüngste B-Zellvorläufer (Fr.A) konnte an Tag E18,5 vor allem im Knochenmark der Embryonen unabhängig vom Genotyp der Tiere nachgewiesen werden. In der fötalen Leber waren zu diesem Zeitpunkt überwiegend die reiferen Vorläufer (Fr.C) lokalisiert, die anhand der

Expression von BP1 und CD24 zu identifizieren waren (Li et al., 1996). Reife B-Zellen, die sich durch das erfolgreiche Rearrangement und die Expression des IgM-Moleküls auszeichneten, konnten insbesondere in der fötalen Milz detektiert werden (Allman und Pillai, 2008). Die durchflusszytometrische Analyse der unreifsten B-Zellvorstufe (Fr.A) läßt darauf schließen, dass die frühe B-Lymphopoese an Tag E18,5 vornehmlich im Knochenmark der Tiere lokalisiert ist (Delassus et al., 1998). Die Überexpression von *clhh* durch die Chondrozyten hatte keinen Einfluss auf die B-Lymphopoese im Knochenmark transgener Tiere. Es waren keine Unterschiede bezüglich der frühen und reifen B-Zellen zwischen den doppelt transgenen und Kontrollembryonen zu beobachten (Abb.3.46). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen zur Identifikation von B-Zellen in der fötalen Leber, dem Knochenmark und der Milz von *Col2-Gal4;UAS-Ihh*-Embryonen und Wildtyp-Kontrolltieren wiesen darauf hin, dass die Überproduktion des *clhh*-Liganden durch die Chondrozyten im embryonalen Knochenmark keine Auswirkungen auf die Entwicklung der B-Zellen hat.

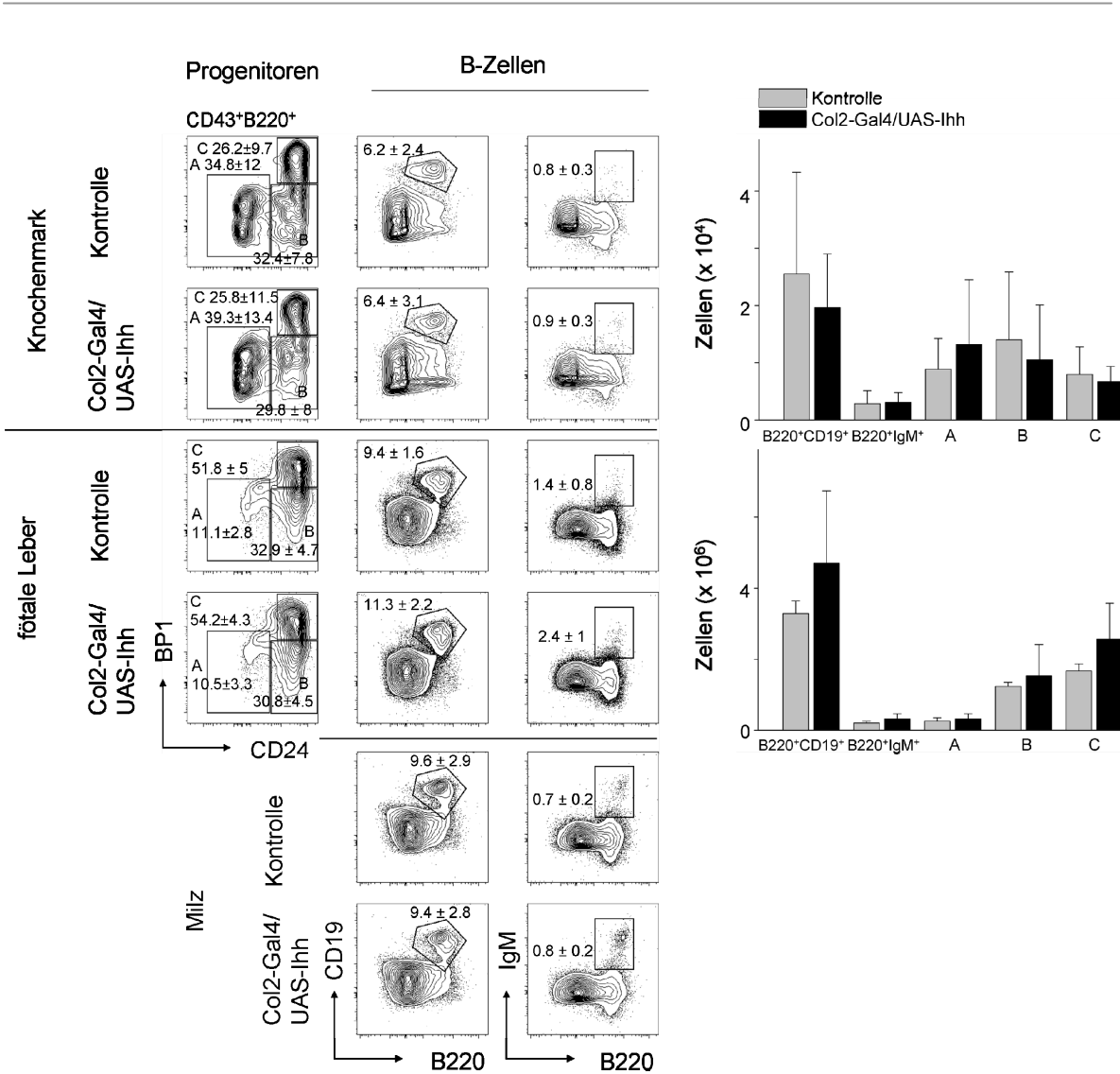


Abb.3.46: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen B-Zellen im Knochenmark, der fötalen Leber und der Milz von Col2-Gal4;UAS-Ihh-Embryonen und Kontrolltieren. Links: Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) der B-Zellprogenitoren, die nach der Hardy-Klassifikation über die Oberflächenantigene CD43, B220, CD24 und BP1 bestimmt (Fraktion A-C) wurden. Der Nachweis reiferer B-Zellen erfolgte mit Hilfe der Antigene B220, CD19 und IgM an Tag E18,5. Rechts: Graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der charakterisierten B-Zellprogenitoren aus Knochenmark und fötaler Leber. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den prozentualen und absoluten Zellzahlen der B-Zellpopulationen von Col2-Gal4;UAS-Ihh- (n=6) und Kontrolltieren (n=10) ermittelt werden ($p > 0,05$).

B-Zell-spezifische Aktivierung des Hh-Signalweges

Der zweite Ansatz zur Untersuchung der B-Zellentwicklung unter dem Einfluss des aktivierten Hh-Signalweges war die intrinsische Manipulation der reifenden B-Zelle durch die CD19-Cre-vermittelte Aktivierung der SmoM2-Expression.

Das CD19-Cre-Transgen aktivierte die Expression des SmoM2-Proteins in CD19-exprimierenden Zellen. Um die Effizienz und den Zeitpunkt der CD19-Cre-Rekombination in den verschiedenen Entwicklungsstadien der B-Lymphopoese zu untersuchen, wurde der YFP-Anteil des SmoM2-YFP-Fusionsproteins, das durch die Aktivierung des R26^{SmoM2}-Allels exprimiert wurde, direkt durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb.3.47). Hierbei konnte gezeigt werden, dass mit der fortlaufenden Entwicklung der B-Lymphozyten der Anteil von SmoM2-exprimierenden B-Zellen mit fortlaufender Ausreifung steigt. Ausgereifte B-Zellen des Knochenmarks der Fraktion E migrieren in die Milz und werden hier zu sogenannten *transitional*-B-Zellen (Hardy et al., 1991; Hardy und Hayakawa, 1995). In der Milz differenzieren diese Zellen zu follikulären (FOL) B-Zellen oder Marginalzonen-B-Zellen. Rezirkulierende FOL-B-Zellen finden sich im Knochenmark als Fraktion F wieder (Allman und Pillai, 2008). Dies konnte anhand des identischen Anteils an SmoM2-exprimierenden Zellen in diesem Zellkompartiment nachvollzogen werden. Den höchsten Anteil an SmoM2-YFP exprimierenden Zellen machte die Gruppe der reifen Marginalzonen- und Plasmazellen der CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere aus (Abb.3.49). Die Effizienz der CD19-Cre-vermittelten Rekombination nimmt, wie für andere Allele bereits beschrieben (Kwon et al., 2008), auch bei dem R26^{SmoM2}-Allel mit zunehmenden Reifegrad zu.

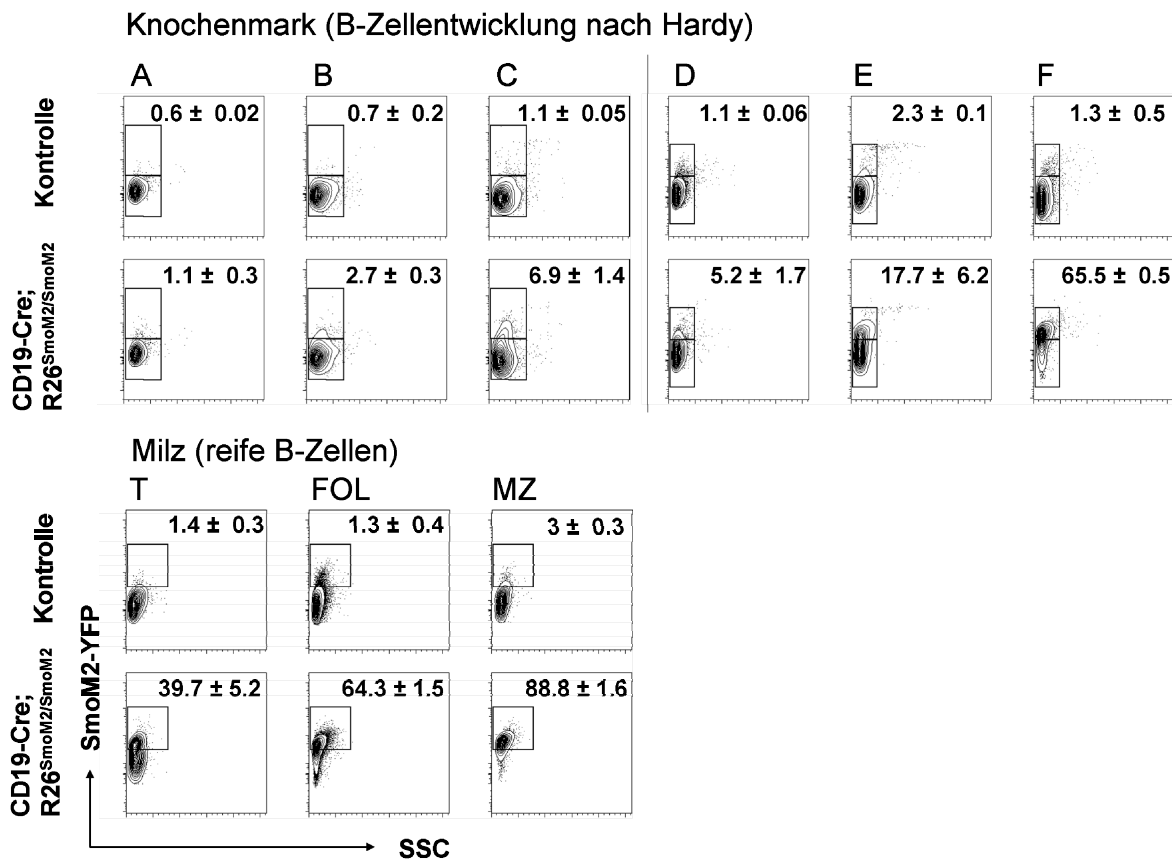


Abb.3.47: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen B-Lymphozyten im Knochenmark und der Milz transgener CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere und Kontrolltiere. Die Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) zeigt die Entwicklung der B-Zellen nach der Hardy-Klassifikation (Fraktionen A-F) im Knochenmark und die reifen Stadien der Milz. Abhängig von dem Entwicklungsgrad steigt der Anteil an Zellen (% der jeweiligen Population), die das SmoM2-YFP-Fusionsprotein auf der Oberfläche exprimieren. CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere und Kontrolltiere, n=6 im Alter von 4 Monaten. T, engl.: *transitional*-; FOL, follikuläre B-Zelle; MZ, Marginalzonen-B-Zelle; SSC, engl.: *side scatter*.

Nachdem die SmoM2-YFP-Expression in den B-Zellen der transgenen Tiere durchflusszytometrisch gezeigt werden konnte, wurde die Verteilung der B-Zellkompartimente der CD19-Cre;R26^{SmoM2}- und der Kontrolltiere miteinander verglichen. Die durchflusszytometrische Analyse und der Vergleich der unterschiedlichen Entwicklungsstufen der B-Lymphozyten im Knochenmark und der reifen B-Zellen der Milz zwischen SmoM2-exprimierenden Tieren (CD19-Cre;R26^{SmoM2}) und Wildtyp-Kontrolltieren ergab keine quantitativen Unterschiede (Abb.3.48). Die frühen B-Zellen wurden hier nach der Hardy-Klassifizierung in die Fraktionen D bis F unterteilt. Diese sogenannten pre-B-Zellen haben das Rearrangement der schweren Immunglobulinkette des B-Zellrezeptors erfolgreich

abgeschlossen und differenzieren in der Milz von *transitional*-B-Zellen zu reifen follikulären oder Marginalzonen-B-Zellen. Dieser Entwicklungsprozess wurde durch die Manipulation des Hh-Signalweges nicht beeinträchtigt.

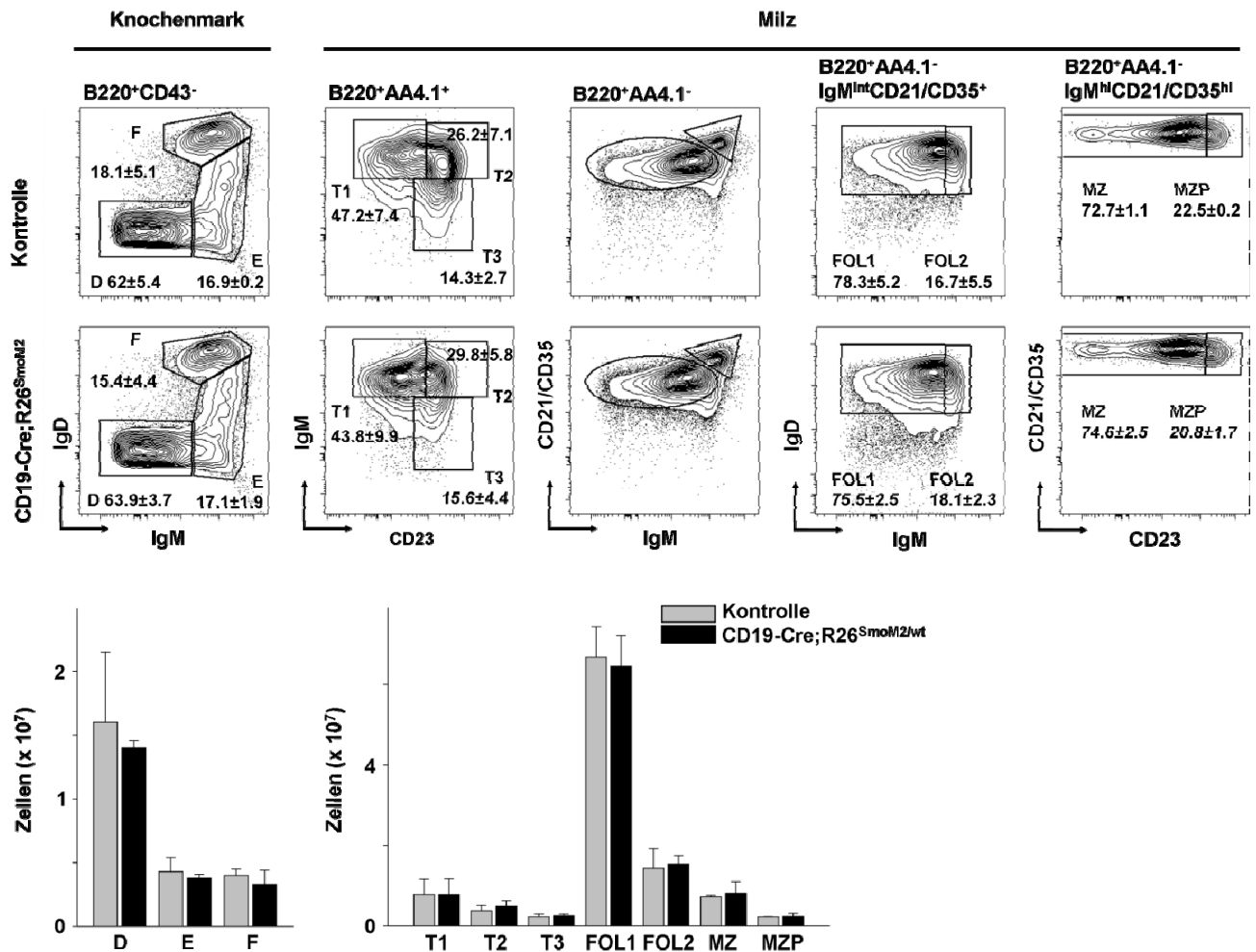


Abb.3.48: Durchflusszytometrische Analyse der frühen und reifen B-Lymphozyten im Knochenmark und der Milz transgener CD19-Cre;R26^{SmoM2/wt}-Tiere und der Kontrolltiere. Oben: Die Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) zeigt die Entwicklung der B-Zellen nach der Hardy-Klassifizierung im Knochenmark und die reifen Stadien der Milz. Unten: Die graphische Darstellungen geben die absoluten Zellzahlen der jeweiligen Populationen wieder ($p > 0,05$). Die Tiere wurden in einem Alter von 6 Monaten analysiert. CD19-Cre;R26^{SmoM2/wt}-Tiere und Kontrolltiere, $n=6$. T, engl.: *transitional*-; FOL1 und 2, follikuläre B-Zellen; MZ, Marginalzonen-B-Zelle.

Plasmazellen sind Antikörper-produzierende B-Zellen. Sie stellen neben der Entwicklung zu B-Gedächtniszellen die reifste Form der B-Zelle dar. Die Plasmazelle exprimiert keine B-Zell-spezifischen Marker, wie CD19 oder B220. Da

Plasmazellen jedoch im Laufe ihrer Entwicklung beide Marker exprimierten, wurde ebenfalls das CD19-Cre-induzierte SmoM2-YFP-Protein exprimiert. Die durchflusszytometrische Identifizierung der Plasmazellen erfolgte mittels der in Kap.3.3.3 beschriebenen Marker. Bemerkenswerterweise konnte in Tieren, die homozygot für das transgene $R26^{SmoM2}$ -Allel waren eine Expansion von Plasmazellen im Knochenmark der CD19-Cre; $R26^{SmoM2/SmoM2}$ -Mäuse im Vergleich zu den Zellen der Kontrolltiere nachgewiesen werden (Abb.3.49).

Die Population der Plasmazellen schien im Knochenmark der CD19-Cre; $R26^{SmoM2/SmoM2}$ -Mäuse durch die intrinsische Aktivierung des Hh-Signalweges expandiert zu sein. Die Studie von Peacock *et al.* (Peacock *et al.*, 2007) legt den Schluss nahe, dass die Expansion der Plasmazellen durch das Hh-Signal als Überlebensfaktor und somit durch eine geringere Apoptoserate verursacht werden könnte. Zudem sprechen diese Ergebnisse dafür, dass möglicherweise die Aktivierung des Hh-Signalweges ein frühes Ereignis in der Entstehung eines multiplen Myeloms darstellt.

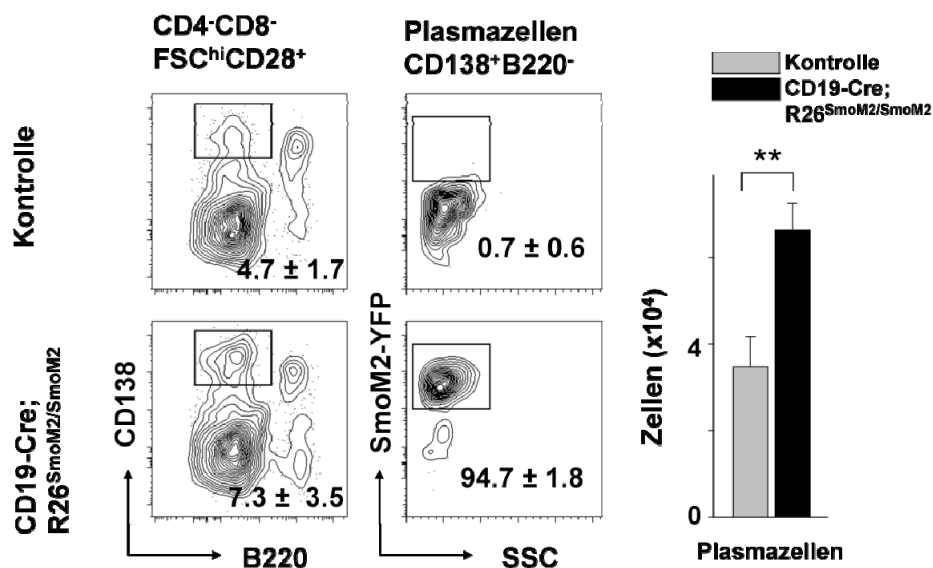


Abb.3.49: Durchflusszytometrische Analyse der Plasmazellen im Knochenmark der CD19-Cre; $R26^{SmoM2/SmoM2}$ -Tiere und der Kontrolltiere. Links: Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo-Software) der Plasmazellen und Nachweis des CD19⁺ B-Zellursprungs mittels des SmoM2-YFP-Fusionsproteins in transgenen Zellen. Rechts: Die graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen zeigt den hoch signifikanten Unterschied (**; p = 0,0044) zwischen den Plasmazellen der transgenen und Wildtyp-Mäuse. Die Tiere wurden in einem Alter von 4 Monaten analysiert. CD19-Cre; $R26^{SmoM2/SmoM2}$ -Tiere und Kontrolltiere, n=3.

Wie unter Kap.3.3.3 beschrieben wurden die Milzen der CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere auf die Anwesenheit von Keimzentren untersucht, um die korrekte dreidimensionale Struktur der Follikel in der Milz zu untersuchen. Die Funktion der sogenannten Keimzentrumsreaktion wurde ebenfalls in Kap.3.3.3 beschrieben. Die HE-Färbung von Paraffinschnitten der Milz von CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Mäusen zeigte unabhängig vom Genotyp der Tiere Lymphfollikel mit anatomisch ausgebildeten Keimzentren. Die Manipulation des Hh-Signalweges hatte demnach keinen Einfluss auf die Aktivierung der B-Zellen. Die Ausbildung von Keimzentren in den Follikeln der Milz wies auf die Fähigkeit zur T-Zell- oder APC (engl.: *antigen presenting cell*)-aktivierten Proliferation der B-Zellen hin (Abb.3.50).

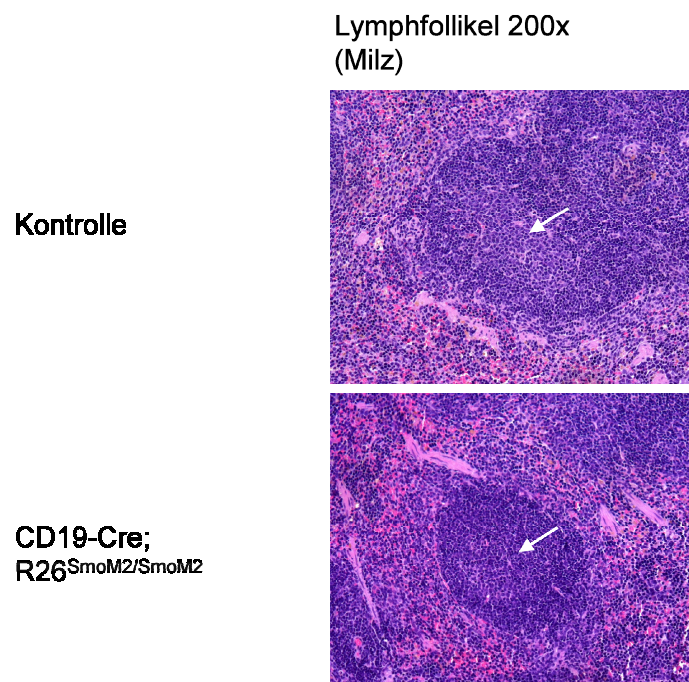


Abb.3.50: Exemplarische HE-Färbung eines Milz-Paraffinschnittes einer CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Maus und einer Wildtyp-Kontrollmaus. Das Keimzentrum (weißer Pfeil) beider Tiere ist in 200x Vergrößerung dargestellt. Die Tiere wurden in einem Alter von 8 Monaten analysiert. CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}- und Wildtyp-Kontrollmäuse, n=3.

Als Reaktion auf ein Antigen produzieren Plasmazellen spezifische Immunglobuline, die in das periphere Blut sezerniert werden. Durch den Nachweis des Immunglobulins IgG2a konnte die Produktion von Antikörpern exemplarisch bestätigt werden (Abb.3.51). Mit Hilfe der ELISA-Technik wurde aus dem Blutserum der transgenen und Wildtyp-Tiere das Immunglobulin IgG2a gemessen.

Der Trend in Richtung erhöhter Immunglobulin-Konzentration bei den CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tieren könnte für eine polyklonale Expansion der Plasmazellen sprechen.

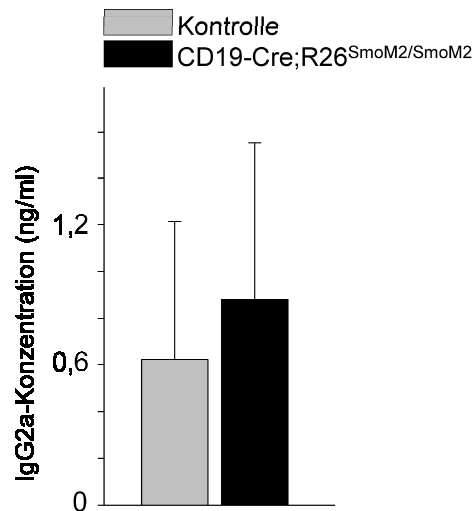


Abb.3.51: Graphische Darstellung der IgG2a-Konzentration aus dem Blutserum transgener CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Tiere und der Kontrolltiere. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen verzeichnet werden ($p > 0,05$). Die Tiere wurden in einem Alter von 4-8 Monaten analysiert. CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}- und Kontrolltiere, $n=6$.

3.4.4 Entwicklung der T-Lymphozyten in SmoM2-transgenen Mäusen

Während der T-Zellentwicklung im Thymus der Maus sind die T-Zellprogenitoren abhängig von den Signalen ihrer zellulären Umgebung. Eine besondere Rolle kommt dabei dem Thymusepithel zu. Die Daten von El Andaloussi *et al.* und Siggins *et al.* sprechen für das Hh-Signal als einen Regulator der T-Zellentwicklung. Der Hämatopoese-spezifische Smo-Verlust und der Epithel-spezifische Ptch-Verlust führten bei den Untersuchungen dieser Gruppen zu einer Reduktion der Thymozyten im Thymus der transgenen Tiere (El Andaloussi *et al.*, 2006; Siggins *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des Hh-Signalweges durch die Expression des SmoM2-Rezeptors zu einer Deregulierung der T-Lymphopoese führt, wurde, wie in Kap.3.3.4 beschrieben, ein Hämatopoese- und Thymusepithel-spezifisches System verwendet (Abb.3.52).

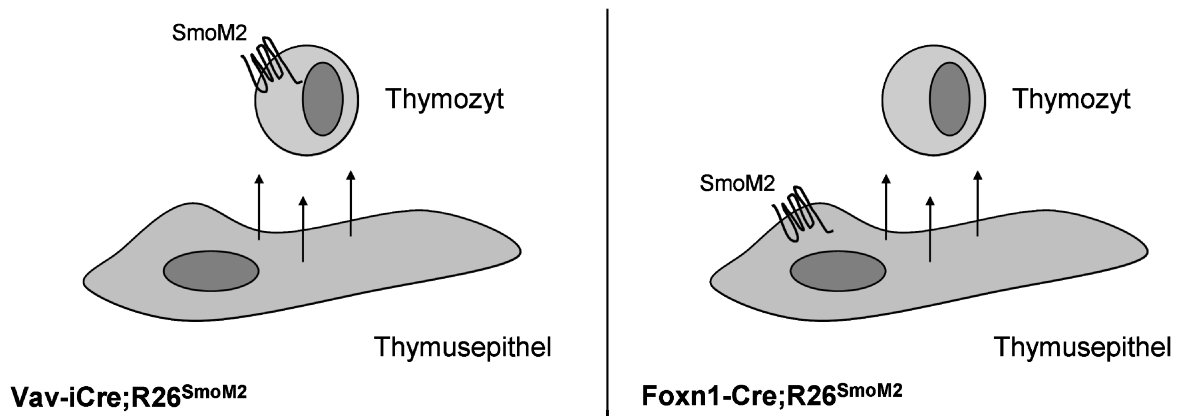


Abb.3.52: Schematische Darstellung der Thymozyten- und Thymusepithel-spezifischen Expression des SmoM2-Rezeptors. In den Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tieren wird das SmoM2-Protein von den Thymozyten exprimiert, während Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere die SmoM2-Mutante Thymusepithel-spezifisch exprimieren.

Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere exprimieren den konstitutiven SmoM2-Rezeptor in den hämatopoetischen Progenitoren, die aus dem Knochenmark in den Thymus wandern um dort auszureifen. Die durchflusszytometrische Analyse der reifen, CD4⁺ oder CD8⁺, SP-Zellen sowie der ISP-, DP- und DN-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede in den prozentualen und absoluten Zellzahlen der untersuchten Populationen von Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tieren im Vergleich zu denen der Kontrolltiere. Es konnte jedoch ein Trend in Richtung erniedrigter absoluter Zellzahlen in den untersuchten Populationen beobachtet werden (Abb.3.54). Zur Charakterisierung der Thymozytenpopulationen wurden die Oberflächenmarker, wie in Kap.3.3.4 beschrieben, verwendet. Diese Daten ließen den Schluss zu, dass die intrinsische Aktivierung des Hh-Signalweges der Thymozyten keinen essentiellen Einfluss auf die Größe oder die Anteile der Thymozyten-reifungsstadien im Thymus hat.

Smo-Überaktivierung im Thymusepithel

Um die Aktivierung des Hh-Signalweges im Thymusstroma zu untersuchen, wurde ein quantitativer *real-time* RT-PCR-Nachweis der Hh-Zielgene verwendet. Die Analyse der Expression der Hh-Zielgene Ptch, Gli1 und BMP4 zeigte einen Anstieg der Expression von Gli1 im Thymusepithel der Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Abb.3.53). Gli1 wurde parallel mit zwei

unterschiedlichen TaqMan® Assays nachgewiesen, weil sich der Nachweis des Transkriptionsfaktors in vorangegangenen Versuchen als schwierig erwies.

Die Expression des Smo-Rezeptors sowie die Expression von Ptch waren tendenziell erhöht, jedoch blieb die Expression von BMP4 von der SmoM2-Expression in den Thymusepithelzellen unbeeinflusst. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Hh-Signalgebung in den Thymusepithelzellen durch den SmoM2-Rezeptor aktiviert wurde.

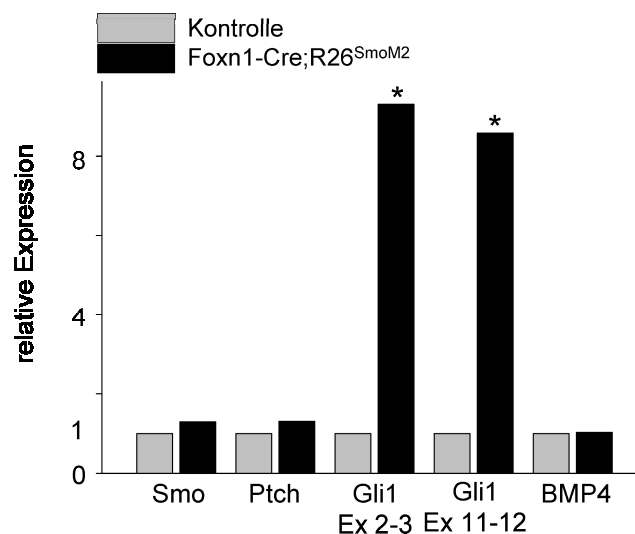
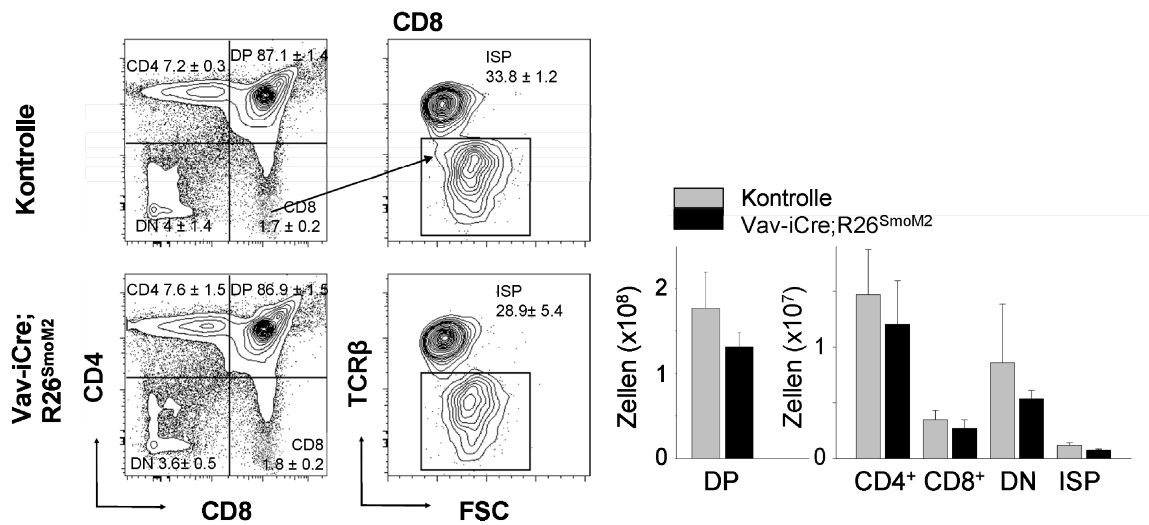


Abb.3.53: Expressionsquantifizierung durch *real-time* RT-PCR-Analyse der Hh-Zielgene Ptch, Gli1 und BMP4 sowie der Hh-Komponente Smo im Thymusepithel der Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere und Kontrolltiere. Die Expression des Smo-Rezeptors und des Zielgens Ptch war tendenziell erhöht. Mit Hilfe zweier Gli1-Nachweise konnte ein signifikanter Anstieg der Expression des Transkriptionsfaktors beobachtet werden (*; Exon 2-3, $p = 0,0085$ und Exon 11-12, $p = 0,016$). Die Tiere wurden in einem Alter von 1 Monat analysiert. Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}- und Kontrolltiere, $n=3$. Relative Expression in n-facher Änderung zur Kontrolle angegeben.

Um die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der T-Zellprogenitoren unter dem Einfluss des SmoM2-exprimierenden Thymusepithels zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen der Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Thymozyten durchgeführt (Abb.3.54). Die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges im Thymusepithel der Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere führte zu einer signifikanten Expansion der DN4-Progenitoren im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Die Entwicklungsstadien vor und nach dem DN4-Stadium, DN3 und ISP, waren ebenfalls tendenziell erhöht, was auf eine Expansion der Thymozytenprogenitoren nach erfolgter β -Selektion innerhalb der äußeren Rinde (Cortex) des Thymus

schließen lässt.

(A)



(B)

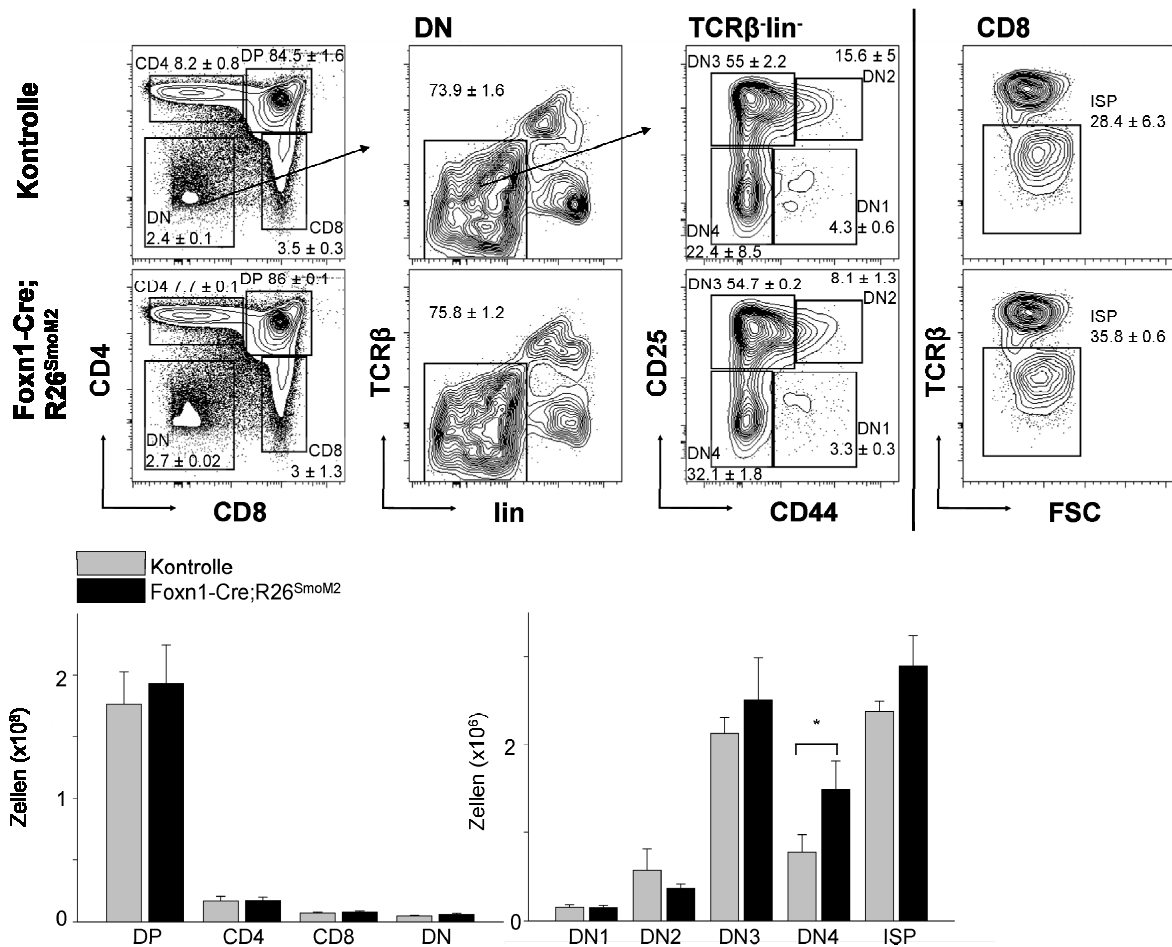


Abb.3.54: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellkompartimente des Thymus. Kontur-Plot-Darstellung (FlowJo Software) der durchflusszytometrischen Analyse der unterschiedlichen T-

Zellstadien in (A) Vav-iCre;R26^{SmoM2}- (n=7) und Kontrolltieren (n=7) sowie (B) Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}- (n=3) und Kontrolltieren (n=3). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen prozentualen und absoluten Zellzahlen der Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Tiere und den Wildtyp-Kontrollen ermittelt werden ($p > 0,05$). Die absoluten Zellzahlen der DN4-Population der Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere zeigte eine signifikante Expansion (*; $p = 0,04$). Die absoluten und prozentualen Zellzahlen der untersuchten Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Populationen, außer der DN4-Vorläufer, wiesen keine signifikanten Unterschiede zur Wildtyp-Kontrolle auf. Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Kontrolltiere wurden im Alter von 2 Monaten, die Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tiere in einem Alter von einem Monat analysiert. Lin, Linienmix; DN, doppelt negativ; DP, doppelt positiv; ISP, engl.: *immature single positive* CD8; TCR β , engl.: *T cell receptor* β .

Die Manipulation des Hh-Signalweges durch die Expression des konstitutiv aktiven SmoM2-Rezeptors in den hämatopoetischen Zellen der Maus resultierte in einer Expansion von Knochenmarkzellen, insbesondere erythrozytärer Vorläufer und Plasmazellen. Es konnte jedoch keine Einwirkung des Hh-Signalweges auf die hämatopoetischen Stammzellen, multipotenten Progenitoren und reifen hämatopoetischen Zellen beobachtet werden. Die durchflusszytometrische Untersuchung des T-Zellkompartiments zeigte unter dem Einfluss der Aktivierung des Hh-Signalweges in Thymozyten keinerlei Auswirkungen auf die Größe der T-Zellpopulationen im Thymus. Die SmoM2-Expression des umgebenden Thymusepithels jedoch bewirkte eine Expansion der DN4-Progenitoren.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse, dass die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges mit Hilfe des SmoM2-Rezeptors keinen gravierenden Einfluss auf die Homöostase der Hämatopoese ausübt. Es scheint, dass das Hh-Signal einen positiven Regulator in der Erythropoese darstellt und mutmaßlich als Überlebenssignal für ausgereifte Plasmazellen im Knochenmark fungiert. Im Thymus bewirkt das SmoM2-exprimierende Thymusepithel eine Expansion von Thymozyten kurz nach erfolgter β -Selektion.

4. Diskussion

4.1 Experimenteller Ansatz und Methodik

Auswahl des experimentellen Modells

Ziel der Arbeit war es die systemischen Folgen einer gezielten Manipulation des Hh-Signalweges *in vivo* zu beobachten. Die Signaltransduktion in einem lebenden Organismus ist komplex und wird von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Die Selbsterneuerung und Differenzierung von HSC werden von extrinsischen Signalen gesteuert, die vom spezifischen zellulären Umfeld der hämatopoetischen Stammzellnische abhängig sind. Bisher ist es technisch nicht möglich dieses spezielle Umfeld, das im Knochenmark von Vertebraten existiert, *in vitro* nachzustellen. Deshalb wurde für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ein *in-vivo*-Modell verwendet.

Ein geeignetes *in-vivo*-System für die Fragestellung dieser Arbeit stellt das Mausmodell dar. Vorteile dieses Modells ist zum einen der im Vergleich zu Invertebratenmodellen relativ hohe Grad an Homologie zum menschlichen Genom (85%, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/homology/maps/>; <http://genomics.energy.gov>, *Human Genome Project Information*) und die verhältnismäßig einfache Zucht. Das wichtigste Argument für die Verwendung eines Maussystems ist die technisch sehr weit fortgeschrittene Methodik zur Herstellung von genetischen Mutanten. Diese Technik bedient sich des Cre/loxP-Rekombinase-Systems des Bakteriophagen P1 und erlaubt es, nicht nur Gene im gesamten Organismus sondern auch spezifisch in bestimmten Organ- bzw. zellulären Systemen zu manipulieren (Gu et al., 1994; Lakso et al., 1992). Zusätzlich ermöglicht die Fusion der Cre-Rekombinase an eine mutierte Liganden-bindende Domäne des murinen Östrogenrezeptors eine zeitliche Steuerung der genetischen Veränderung (Brocard et al., 1997; Danielian et al., 1998). Dementsprechend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Hämatopoese-spezifische transgene Cre/loxP-Mausmodelle verwendet, um den Einfluss des Hh-Signalweges auf das blutbildende System *in vivo* zu untersuchen.

Die Signalwegkomponenten des Hh-Signalweges liegen in Maus und Menschen konserviert vor. Für die drei Hh-Liganden Ihh, Dhh und Ihh sowie für die Ptch1-,

Ptch2- und Smo-Membranproteine existieren bei Maus und Mensch homologe Moleküle. Für die Effektormoleküle Gli1-Gli3, die *downstream* des Signalweges liegen, existieren ebenfalls bei Maus und Mensch homologe Moleküle (Varjosalo und Taipale, 2008).

Bemerkenswerterweise führen die innerhalb von humanen Tumoren erworbenen Mutationen von Hh-Signalwegkomponenten auch bei genetisch modifizierten Mäusen zu ähnlichen Tumorerkrankungen. Beispielsweise führt die aus humanen Basaliomen klonierte Mutation SmoM2 auch im Mausmodell zur Transformation von Keratinozyten und zur Ausbildung von Basaliom-ähnlichen Tumoren (Goodrich et al., 1997; Xie et al., 1998).

Das hämatopoetische System der Maus und des Menschen zeigen jedoch auch divergente Strukturen. Es ist zu berücksichtigen, dass die beiden hämatopoetischen Systeme von Maus und Mensch insbesondere phänotypische Unterschiede bei der Expression von z. B. Oberflächenmolekülen aufweisen (Okuno et al., 2002). Zu den funktionellen Unterschieden gehört der Unterhalt einer signifikanten HSC-Population in der Mausmilz, die sich in dieser Ausprägung im humanen System nicht nachweisen lässt (Kiel et al., 2005). Dennoch ist hervorzuheben, dass die zentralen Zelllinien und die hierarchische Struktur von Maus und Mensch in der Hämatopoese nahezu identisch sind. Somit sind die bekannten spezifischen Unterschiede bei der direkten Übertragung von Erkenntnissen zwischen den beiden Systemen zu berücksichtigen.

Zusammenfassend stellen genetisch modifizierte Mausmodelle valide Systeme zur Untersuchung der hämatopoetischen Funktion des Hh-Signalweges dar.

Die Schlüsselkomponente Smoothed

Ziel dieser Arbeit war die Rolle des Hh-Signalweges innerhalb des hämatopoetischen Systems mit Hilfe transgener Mausmodelle zu untersuchen. Deshalb war es von Bedeutung, eine zentrale Hh-Signalwegkomponente innerhalb des Mausmodells genetisch zu manipulieren. Die einzige nicht redundante Komponente des Hh-Signalweges ist der Smo-Rezeptor. Dementsprechend wurde Smo als Ziel der genetischen Manipulation innerhalb des murinen hämatopoetischen Systems gewählt.

Von Vorteil für die Durchführung dieser Arbeit war, dass für den Smo-Rezeptor bereits Smo-*knockout*- (Zhang et al., 2001) und konditionale Smo^{loxP}-Mäuse (Long et al., 2001) verfügbar waren. Ebenfalls waren Funktionsgewinn-Modelle verfügbar, die die Überexpression der SmoM2-Mutante (Jeong et al., 2004) oder des Ihh-Liganden des Huhns (Long et al., 2001) beinhalteten.

Die Hämatopoese-spezifische Rekombination der genetisch veränderten Smo-Allele wurde innerhalb dieser Arbeit durch die Verkreuzung mit unterschiedlichen Cre-transgenen Mäusen erreicht. Diese Modelle beinhalteten die Vav-iCre- (de Boer et al., 2003), die HSC-SCL-Cre-ER^T- (Gothert et al., 2005), die CD19-Cre- (Rickert et al., 1995) und die Foxn1-Cre-transgenen Mäuse (Gordon et al., 2007).

Zucht, Genotypisierung und Haltung der genetisch modifizierten Mausmodelle

Die verwendeten genetisch modifizierten Smo-Allele (Smo^{loxP}-, Smo^{Null}- und R26^{SmoM2}) wurden von anderen Arbeitsgruppen erstellt und etabliert. (Jeong et al., 2004; Long et al., 2001; Zhang et al., 2001). Mäuse, die diese Allele tragen, sind über *The Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine, USA) international verfügbar. Die für die Rekombination der konditionalen Allele verwendete HSC-spezifische HSC-SCL-Cre-ER^T-transgene Maus war in der hiesigen Arbeitsgruppe bereits vorhanden (Gothert et al., 2005). Die Vav-iCre- und CD19-Cre-Tiere waren ebenfalls über *The Jackson Laboratories* verfügbar. Die Foxn1-Cre-Mäuse wurden freundlicherweise von Frau Nancy Manley [Athens, Georgia, USA, (Gordon et al., 2007)] für die Versuche bereitgestellt.

Für die Genotypisierung der Cre-, Vav-iCre- und transgenen R26-Mäuse konnte auf etablierte PCR-Protokolle zurückgegriffen werden (Emambokus und Frampton, 2003; Soriano, 1999). Die PCR-Protokolle inklusive die Herstellung der Primer für den Nachweis der Smo^{Null}- und Smo^{loxP}-Allele wurden innerhalb dieser Arbeit generiert. Als besonders zeitaufwendig erwies sich die Etablierung von PCR-Protokollen für den Nachweis der Cre-rekombinierten Smo^{loxP}- und R26^{SmoM2}-Allele, die bisher in der Literatur nicht zur Verfügung standen. Zusätzlich wurde ein spezifischer RT-PCR-Nachweis für die Expression des SmoM2-Transkriptes etabliert. Alle in dieser Arbeit verwendeten selbst entworfenen PCR-Nachweise zur Genotypisierung der Tiere und zur Evaluation des jeweiligen genetischen

Systems wurden durch eine DNA-Sequenzierung der amplifizierten Produkte bestätigt.

Die Zucht von Mäusen, die bis zu drei unterschiedliche transgene Allele tragen, ist ein zeitaufwendiger Prozess, der mindestens 5 Monate beansprucht. Die Generierung großer Versuchsgruppen war durch die begrenzte Möglichkeit zur Maushaltung und den erwarteten niedrigen Anteil an dreifach-transgenen Nachkommen limitiert. Weiterhin war die Anzahl der Mäuse pro Versuchsgruppe durch die Verwendung von Wurfgeschwistern als Wildtyp-Kontrolltiere begrenzt. Dennoch sind für jedes Experiment mindestens drei genetisch modifizierte experimentelle Mäuse und mindestens drei passende Kontrollmäuse (Wurfgeschwister) verwendet worden.

Während der Zucht der Versuchstiere konnten keine makroskopischen Unterschiede zu den Wildtyp-Geschwistern beobachtet werden. Ebenso unauffällig gestaltete sich der Habitus der Versuchstiere. Zwei Ausnahmen bildeten die Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und die Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Mäuse. Die Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäuse fielen ab der 12. Lebenswoche durch eine ataktische Laufweise auf. Die Tiere wurden getötet und die Präparation der Gehirne und die anschließende histologische Untersuchung (Institut für Pathologie und Neuropathologie) ergab die Diagnose eines malignen Tumors des Kleinhirns, der am ehesten einem Medulloblastom entsprach. Da eine Aktivität des Vav-iCre-Transgens im Cerebellum beschrieben wurde (de Boer et al., 2003), ist davon auszugehen, dass die Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels zur Expression des SmoM2-Proteins im Cerebellum führte und somit für die Entstehung von Medulloblastomen (Goodrich und Scott, 1998) in Vav-iCre;R26^{SmoM2}-Mäusen verantwortlich war. Um systemische Einflüsse des zerebralen Malignoms zu umgehen, wurde das Hh-manipulierte hämatopoetische System dieser Tiere innerhalb der ersten 10 Lebenswochen vor dem Auftreten von Medulloblastomen analysiert. Die Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Mäuse wiesen nach 10-12 Wochen ulzerierende Hautläsionen im Perianalbereich auf. Die histologische Untersuchung erbrachte den Nachweis von Basaliom-ähnlichen Neoplasien in diesen Hautarealen. Die Entstehung von Basaliomen ist auf die Aktivität des Foxn1-Cre-Transgens und folgedessen auf die Induktion der SmoM2-Expression in einigen Hautzellen zurückzuführen (Gordon et al., 2007; Mecklenburg et al., 2001). Auch die Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Mäuse wurden vor dem Auftreten der Haut-

veränderungen analysiert, um systemische Effekte eines Malignoms auszuschließen. Die Entstehung der SmoM2-abhängigen Medulloblastome und Basaliome bei den Vav-iCre;R26^{SmoM2}- und Foxn1-Cre;R26^{SmoM2}-Tieren wies die Funktionalität des R26^{SmoM2}-Allels in den verwendeten Systemen nach (McMahon et al., 2003).

Zur Induktion der Hh-Manipulation in den HSC wurde eine Cre-ER^T-Rekombinase verwendet, die über das HSC-SCL-Cre-ER^T-Allel exprimiert wurde. Um die Translokation Cre-ER^T-Rekombinase aus dem Zytoplasma in den Nukleus zu induzieren, wurden die entsprechenden Versuchstiere und die jeweiligen Kontrollen mit Tamoxifen behandelt. Die Fütterung der Tiere mit TAM-angereichertem Futter verursachte weniger körperlichen Stress als die intraperitoneale Injektion. Jedoch wurde das TAM-haltige Futter nicht von allen Tieren in gleicher Weise angenommen, und so kam es teilweise zu Gewichtsabnahmen bei diesen Mäusen. Es erfolgte eine tägliche Gewichtsdokumentation und bei einer Abnahme von mehr als 10% des Körpergewichtes innerhalb einer Woche wurde die Gabe des TAM-Futters abgebrochen und die TAM-Applikation der gesamten Versuchsgruppe durch intraperitoneale Injektion fortgesetzt.

Um zu untersuchen, ob möglicherweise Ihh, das auch von Stromazellen der Knochenmarkhöhle exprimiert wird (Long et al., 2001; Vortkamp et al., 1996; Vortkamp et al., 1998) den normalen Ablauf der B-Zellentwicklung in wachsenden Röhrenknochen beeinflusst, wurde ein System verwendet, bei dem Ihh des Huhns (clhh; engl.: *chicken*) innerhalb des wachsenden Knochens überexprimiert wird. Der clhh-Ligand wurde mit Hilfe des bigenen Col2a1-Gal4;UAS-Ihh-Systems in den unreifen Chondrozyten des Röhrenknochens überexprimiert. Aufgrund der direkten Nachbarschaft der unreifen Chondrozyten zu der Knochenmarkhöhle diffundiert überexprimiertes chondrales clhh in die Knochenmarkhöhle und beeinflusst dort möglicherweise die B-Zellentwicklung. Die Untersuchungen an dem Col2a1-Gal4;UAS-Ihh-System beschränkten sich auf die Pränatalperiode, da die clhh Überexpression faciale und cephalische Missbildungen zur Folge hat, die mit einem postnatalen Überleben nicht vereinbar sind (Kobayashi et al., 2005).

Bigene Col2a1-Gal4;UAS-Ihh-Embryonen und Kontrollembryonen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Andrea Vortkamp (Abteilung für Entwicklungsbiologie der

ZMB/Fakultät für Biologie und Geographie an der Universität Duisburg-Essen) für die Untersuchungen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten transgenen Systeme wurden erfolgreich durch Verkreuzungen hergestellt und wiesen die erwartete Funktionalität auf.

Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie stellte die Hauptanalysemethode dieser Arbeit dar. Diese Methode bietet die Möglichkeit über Oberflächenmoleküle bestimmte Zellpopulationen zu identifizieren. Das besondere Merkmal der Durchflusszytometrie ist, dass alle Parameter auf Einzelzellebene bestimmt werden.

Von besonderer Bedeutung für diese Methodik ist die Auswahl der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, die mit besonderer Sorgfalt durchgeführt wurde. Mit Hilfe der BD FACSDiva-Software (Version 6.1.1)-gestützten Kompensation wurden die Überlappungen der Emissionspektren der verwendeten Fluorochrome bei den jeweiligen Messungen berücksichtigt. Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurden die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper titriert und mit einer entsprechenden Isotyp-Kontrolle getestet. Die jeweilige Antikörper-Kombination wurde vor der Verwendung im Versuch mit den genetisch modifizierten Mäusen mit Zellen von Wildtyp-Tieren optimiert. Um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen zu minimieren, wurden für die Analyse hämatopoetischer Subpopulationen ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet.

Für die Qualität der durchflusszytometrischen Daten ist bereits die initiale Organpräparation der Embryonen und der adulten Versuchstiere von besonderer Bedeutung. Die Präparation der hämatopoetischen Organe Knochenmark, Thymus und Milz wurde nach einem standardisierten Verfahren durchgeführt, so dass die isolierten Zellen der Gewebe unter identischen Bedingungen analysiert wurden.

Die anschließenden Analysen der isolierten und Antikörper-gefärbten Zellen wurden aufgrund der wechselnden Infrastruktur während der Zeit des Projektes an unterschiedlichen Durchflusszytometern durchgeführt. Die Messungen erfolgten zunächst am BD FACSCanto™ II und anschließend am BD™LSR II Durchflusszytometer. Da unter Umständen unterschiedliche Geräte, Antikörperkombinationen und *gating*-Strategien zu unterschiedlichen Ergebnissen

führen können, wurden diese Variablen innerhalb eines Versuchs immer konstant gehalten.

Die durchflusszytometrischen Daten, wenn keine definierten Referenzpartikel (engl.: *beads*) mitgemessen werden, stellen prozentuale Anteile von definierten Zellpopulationen an der gemessenen Gesamtpopulation dar. Da der prozentuale Anteil einer Zellpopulation bei zwei Tieren trotz unterschiedlicher Gesamtorganzellularität gleich bleiben kann, wurden aus den prozentualen Anteilen und absoluten Organzellularitäten die absoluten Zellzahlen der Subpopulationen pro Organ ermittelt. Die absolute Zellzahl pro Organ stellt die stichhaltigste Quantifizierungsmöglichkeit einer Zellpopulation dar.

Über die aufgeführten speziellen methodischen Vorkehrungen bei der durchflusszytometrischen Durchführung und Auswertung, wurden die Vorzüge dieser Methodik voll ausgeschöpft.

Genomischer Smo-Verlust in transgenen Mausmodellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass der genetische Verlust der Hh-Signalwegkomponente Smo keinen Einfluss auf den normalen Ablauf der Hämatopoese hat. Demnach war der Nachweis des genetischen Smo-Verlustes innerhalb der Hämatopoese von zentraler Bedeutung. Dieser Nachweis gelang zum einen über den Verlust des nicht-rekombinierten Smo^{loxP}-Allels und zum anderen durch den direkten Nachweis des rekombinierten Smo^{loxP}-Allels mittels PCR-Analysen in den Knochenmarkzellen der transgenen Tiere.

Der vollständige Verlust des nicht-rekombinierten Smo^{loxP}-Allels in den Zellen der Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Mäuse spricht für die hohe Effizienz des Vav-iCre-Transgens. Parallel zu dem genomischen Nachweis konnte ebenfalls auf Ebene der mRNA die erfolgte Deletion des Smo-Exon 1 gezeigt werden. Bei Anwesenheit des Vav-iCre-Transgens konnte kein Smo-Transkript, welches das Exon 1 beinhaltete, innerhalb von Knochenmarkzellen nachgewiesen werden. Da die CD19-Cre- und die Foxn1-Cre-Transgene jeweils nur in zellulären Subpopulationen ihrer Zielgewebe aktiv sind, war zu erwarten, dass bei den PCR-Analysen neben dem rekombinierten Smo-Allel auch ein genetisch intaktes Smo-Allel nachzuweisen war.

Zusätzlich zu der konventionellen RT-PCR-Analyse wurden quantitative *real-time* RT-PCR-Analysen durchgeführt, die jedoch nicht spezifisch für das genomisch

deletierte Smo-Exon 1 waren. Vermutlich wurde aufgrund dessen nur eine niedrigere und nicht vollständig abwesende Smo-Expression in den experimentellen Tieren nachgewiesen. Die Ergebnisse der PCR-Analysen lassen den Schluss zu, dass unabhängig von der genomischen Deletion des Smo-Exon 1 Smo-Transkripte mit den verbleibenden Exonen 2-12 entstehen.

Als indirekter Nachweis für die erfolgreiche Smo-Deletion ist ebenfalls die quantitative Ptch-Expressionsanalyse zu werten. Ptch ist ein direktes Zielgen des Hh-Signalweges. Dementsprechend konnte eine Herunterregulation der Ptch-mRNA innerhalb von Knochenmarkzellen mit genetischem Smo-Verlust nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise war das Transkript des Hh-Zielgens Gli1 innerhalb von Wildtyp-Knochenmarkzellen kaum nachweisbar. Infolgedessen war der Nachweis einer möglichen Gli1-Herunterregulation, verursacht durch die Smo-Deletion, technisch nicht möglich. Die niedrige Gli1-Expression könnte durch eine niedrige Aktivität des Hh-Signalweges innerhalb von Knochenmarkzellen verursacht sein. Jedoch ist bei dieser Schlussfolgerung zu berücksichtigen, dass die Gli1-mRNA nachweislich verhältnismäßig stark an Proteine gebunden ist und zudem auch relativ instabil ist (Noubissi et al., 2009). Demzufolge ist die Detektion des Gli1-Transkriptes als technisch schwierig zu bewerten und könnte ebenfalls die Ursache für die niedrige Gli1-Expression im Knochenmark sein. Gegen diese Möglichkeit spricht, dass das mit gleicher Methode gemessene Gli1-Expressionsniveau im Thymusstroma vergleichsweise sehr viel höher war.

Weiterhin wurde versucht mittels eines polyklonalen Antikörpers den genetischen Smo-Verlust auf Proteinebene nachzuweisen. Dabei ist anzumerken, dass bei der Durchflusszytometrie möglichst monoklonale Antikörper zu verwenden sind, da polyklonale Antikörper zumeist häufiger unspezifisch an Zellen binden. Es stand jedoch kein kommerzieller monoklonaler Smo-Antikörper zur Verfügung. Mit einem polyklonalem *goat* α -Smo-Antikörper und einem sekundären Fluoreszenzmarkierten *donkey* α -*goat*-Antikörper war es möglich ein Smo-Signal auf Zellen von einer *Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}*-Maus nachzuweisen, das vergleichbar zu der Wildtyp-Kontrolle war (Abb.7.1). Jedoch ist dieser Smo-Nachweis auf Proteinebene in Anbetracht der Polyklonalität des verwendeten Antikörpers und der bereits erwähnten genetischen Daten als unspezifisch zu werten.

Zusammenfassend konnte aufgrund des Nachweises der Cre-vermittelten Rekombination auf genomischer Ebene und dem Verlust des entsprechenden Smo-Transkriptes gezeigt werden, dass mit Hilfe der verwendeten genetischen Systeme Smo innerhalb der Hämatopoese erfolgreich ausgeschaltet wurde.

Überaktivierung der Hh-Signaltransduktion in genetisch modifizierten Mäusen

Komplementär zu dem genetischen Smo-Verlust-Modell sollte eine Überaktivierung des Hh-Signalweges mit Hilfe der Cre-vermittelten Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels erreicht werden. Der Nachweis der erfolgreichen Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels und der Funktionalität des exprimierten SmoM2-YFP-Fusionsproteins erfolgte auf mehreren Ebenen. Zunächst wurde die Cre-vermittelte Deletion der STOP-Kassette innerhalb des R26^{SmoM2}-Allels mit Hilfe einer konventionellen PCR-Analyse auf genomischer Ebene nachgewiesen. Im Anschluss erfolgte der spezifische Nachweis der SmoM2-YFP-mRNA mittels SmoM2-spezifischen Primern. Zusätzlich konnte mittels *real-time* RT-PCR-Analyse eine gesteigerte Smo-Expression in denjenigen Geweben gezeigt werden, die eine Cre-Aktivität aufwiesen (Anhang, Abb 7.1). Außerdem führte die Aktivierung des R26^{SmoM2}-Allels innerhalb von Thymusepithelzellen zu einer ausgeprägten Steigerung der Expression des Hh-Zielgens Gli1. Zudem gelang auf Proteinebene der direkte Nachweis der YFP-Fluoreszenz des SmoM2-YFP-Proteins innerhalb von homozygoten CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Mäusen, was ebenfalls für die erfolgreiche Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels spricht. Die Expression des SmoM2-YFP-Fusionsproteins innerhalb dieser Tiere konnte zusätzlich mit Hilfe eines α -GFP-Antikörpers, der in der Lage ist den YFP-Anteil des Proteins zu detektieren, und mittels Konfokalmikroskopie gezeigt werden. Schließlich bewiesen Hh-Signalweg-assoziierte maligne Veränderungen, die durch die Cre-Expression außerhalb der vorgesehenen hämatopoetischen Zielzellen induziert wurden (innerhalb des Kleinhirns und der Haut), die Funktionalität des R26^{SmoM2}-System.

Zusammenfassend ist der Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination des R26^{SmoM2}-Allels und der damit einhergehenden Überaktivierung des Hh-Signalweges auf DNA-, mRNA-, Protein- und funktioneller Ebene erbracht worden.

4.2 Folgen der genetischen Smo-Manipulation auf hämatopoetische Stammzellen und Progenitoren

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war bekanntermaßen, die Rolle des Hh-Signalweges auf das hämatopoetische System zu untersuchen. Insbesondere lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung von HSC und hämatopoetischen Progenitoren. HSC besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in alle unterschiedlichen Blutzelllinien. Für die Steuerung des Gleichgewichtes zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung werden Signale der Stammzellnische im Knochenmark verantwortlich gemacht. Jedoch sind die beteiligten Signalwege und exakten Mechanismen, die dieses Gleichgewicht steuern, weitgehend unbekannt. Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass den morphogenen Signalwegen Notch und Wnt eine besondere Rolle bei der Regulation der HSC zukommt. Aufgrund dieser Arbeiten fokussierte sich die internationale Wissenschaft auf den Hh-Signalweg. Zum Zeitpunkt der Fragestellung Anfang des Jahres 2007 waren wenige Daten zu diesem Themenbereich publiziert.

Obwohl der morphogene Hh-Signalweg während der Entwicklung in unterschiedlichen Organsystemen eine zentrale Bedeutung für die Zelllinien-Entscheidungen hat (Nusslein-Volhard und Wieschaus, 1980), wird die Rolle dieses Signalweges für die Funktion der HSC und für die Regulation der Hämatopoese kontrovers diskutiert. Murine embryonale Stammzellen, die einen *Ihh*- oder *Smo-knockout* aufwiesen, waren nicht in der Lage, in hämatopoetische Zellen zu differenzieren (Byrd et al., 2002; Maye et al., 2000). Im Gegensatz hierzu zeigten Hh-mutante Zebrafisch-Embryonen eine normale primitive Hämatopoese. Jedoch ist die Entstehung definitiver HSC in den Zebrafisch-Mutanten durch den Verlust des Hh-Signals defizient (Gering und Patient, 2005). Zudem sind die Liganden Shh und Ihh in der Lage die Expansion von humanen Langzeit-repopulierende HSC *in vitro* zu aktivieren, was ebenfalls für eine wichtige Rolle des Hh-Signalweges für definitive HSC spricht (Bhardwaj et al., 2001; Kobune et al., 2004). Wiederum konträr zu den Zebrafisch- und *in-vitro*-Beobachtungen waren Untersuchungen in Shh- (Chiang et al., 1996), Dhh- (Bitgood et al., 1996) und *Ihh-knockout*-Mausmodellen (Byrd et al., 2002), die keine Hinweise auf eine Rolle des Hh-Signalweges als zentralen

hämatopoetischen Regulator erbrachten. Die aufgeführten Arbeiten bildeten die Rationale für die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Vav-iCre- und des Tamoxifen-induzierbaren HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgens ein genetischer Smo-Verlust in HSC und Progenitorzellen *in vivo* erreicht. Die Vav-Promotor-gesteuerte Expression des iCre-Transgens setzt ab der Entstehung der ersten definitiven HSC aus hämogenem Endothel ein. Demzufolge wurde Smo mit Hilfe dieses Systems zu einem sehr frühen Zeitpunkt innerhalb sich entwickelnder hämatopoetischer Stammzellen ausgeschaltet. Die Deletion von Smo mit Hilfe des HSC-SCL-Cre-ER^T-Transgens erfolgte zeitlich kontrolliert durch die Applikation von Tamoxifen in adulten Mäusen. Weder die Vav-iCre-, noch die HSC-SCL-Cre-ER^T-vermittelte Deletion führte zu offensichtlichen äußeren Veränderungen der Mäuse. Die Tiere, die einen Vav-iCre-vermittelten Smo-Verlust auswiesen, wurden in einer den Mendel'schen Regeln entsprechender Häufigkeit geboren, was bereits darauf schliessen ließ, dass kein schwerwiegender hämatopoetischer Defekt bei diesen Mäusen vorlag. Die peripheren Blutparameter und die Zellularität der hämatopoetischen Organe waren bei den Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Tieren nicht verändert. Die detaillierten durchflusszytometrischen Untersuchungen der HSC und Progenitorkompartimente von Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}- und SCL-Cre-ER^T;Smo^{loxP/Null}-Tieren ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen. Diese Daten waren zudem in Einklang mit den Ergebnissen der *Colony-Assays*, die keine funktionelle Einschränkung von Knochenmark-progenitoren mit genetischem Smo-Verlust ergaben.

Parallel zu den Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit, veröffentlichten andere Arbeitsgruppen Daten, die ebenfalls für eine durch die Deletion von Smo, unbeeinträchtigte Funktion der HSC und Progenitoren sprachen. Diese Daten wurden mittlerweile publiziert (Dierks et al., 2008; Gao et al., 2009; Hofmann et al., 2009). Diese Arbeitsgruppen führten zusätzlich auch Transplantationsexperimente durch, die zeigten, dass die Langzeit-repopulierende Aktivität von definitiven HSC der fötalen Leber und des adulten Knochenmarks durch einen Smo-Verlust nicht verändert wird. In Anbetracht dieser durch mehrere Arbeitsgruppen, bereits bestätigten Daten wurden im Zuge dieser Arbeit keine Transplantationsexperimente durchgeführt und der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen

vornehmlich auf die Rolle von Smo innerhalb der Lymphozytenentwicklung gerichtet.

Jedoch stehen die Ergebnisse der Transplantationsexperimente mit Smo-defizientem Knochenmark der Gruppe von Tannishtha Reya (Zhao et al., 2009) im Widerspruch zu den oben erwähnten Arbeiten (Dierks et al., 2008; Gao et al., 2009; Hofmann et al., 2009). Zhao *et al.* verwendete das gleiche Vav-iCre-Transgen, das auch in der vorliegenden Arbeit benutzt wurde. Die primären und sekundären Transplantationsexperimente von Zhao *et al.* zeigten eine verminderte Langzeit-Rekonstitution durch Smo-defizientes Knochenmark. Diese zu den oben erwähnten Arbeiten diskrepanten Ergebnisse lassen sich möglicherweise mit dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Mäuse erklären. Jedoch stimmen die Daten von Zhao *et al.* mit den hier dargelegten Beobachtungen bezüglich des Vav-iCre-induzierten genetischen Smo-Verlustes und der daraus resultierenden unveränderten Stammzellpopulation im Knochenmark überein.

In der Arbeit von Gao *et al.* (Gao et al., 2009) wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, das R26^{SmoM2}-Allel verwendet. Die vorliegende Arbeit und die Arbeit von Gao *et al.* sprechen dafür, dass eine Aktivierung des Hh-Signalweges durch die Expression des SmoM2-YFP-Proteins zu keiner Expansion des Stammzellkompartimentes führt. Gao *et al.* verwendeten das Interferon-induzierbare Mx1-Cre-Transgen und beschreiben ebenfalls Kolonie-bildende Progenitoren im Knochenmark, die mittels Smo-Überaktivierung nicht verändert wurden, vergleichbar zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassend stimmen die Daten der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen überein. Die normale Homöostase von hämatopoetischen Stammzellen wird weder durch einen Smo-Verlust noch durch eine Smo-Überaktivierung gestört.

4.3 Folgen der genetischen Smo-Manipulation auf die Entwicklung von B- und T-Zellen

Smo-Manipulation innerhalb der B-Lymphopoese

Die Entwicklung von B-lymphozytären Zellen ist ein komplexer Vorgang, der über mehrere Zwischenstufen abläuft und vornehmlich über die schrittweise Generierung eines klonalen B-Zellrezeptors definiert ist. Hauptort der primären Entwicklung von B-Zellen ist das Knochenmark, während die weitere terminale Entwicklung von B-Zellsubtypen, wie den Marginalzonen- oder follikulären B-Zellen, in der Milz und in den Lymphknoten abläuft.

Für eine Rolle des Hh-Signalweges in der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen spricht, dass die adenovirale Überexpression von Ihh *in vivo* zu einer Expansion von follikulären B-Zellen führte (Kobune et al., 2008). Zusätzlich fördert die Produktion von Shh durch dendritische Zellen das Überleben follikulärer B-Zellen innerhalb des Keimzentrums der Lymphfollikel (Sacedon et al., 2005). Weiterhin beschreiben mehrere Studien, dass der Hh-Signalweg bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (Dierks et al., 2007), wie dem diffus großzelligen B-Zelllymphom (Singh et al., 2010), der chronisch lymphatischen B-Zell Leukämie (Hegde et al., 2008) und dem multiplen Myelom (Peacock et al., 2007) eine wichtige Rolle spielt. Überwiegend vermittelt der Hh-Signalweg ein Überlebenssignal innerhalb von malignen B-Zellen.

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein genetischer Smo-Verlust, vermittelt durch die Vav-iCre- und CD19-Cre-Transgene, die normale B-Zellentwicklung beeinflusst. Die detaillierten durchflusszytometrischen Analysen ergaben keine Beeinträchtigung der B-Zellentwicklungsstufen von der lymphozytären Vorläuferzelle bis zur reifen Antikörper-produzierenden Plasmazelle durch die Deletion von Smo. Auch histomorphologisch waren Keimzentrums-B-Zellen innerhalb der Smo-defizienten Mäuse zu beobachten. Weiterhin erschien die IgG-Antikörperproduktion bei diesen Mäusen unbeeinträchtigt.

Diese Befunde sind von Bedeutung, da die detaillierte Untersuchung der B-Zellentwicklung in der Abwesenheit von Smo bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde.

Zudem wurden die hier beschriebenen Untersuchungen der B-Zellentwicklung nach einer Überaktivierung des Hh-Signalweges durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt (Gao et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Gao *et al.* aktivierte das R26^{SmoM2}-Allel mit Hilfe des induzierbaren Mx1-Cre-Transgen innerhalb der Hämatopoese und beschrieb, dass B220⁺CD43⁺ pro-B-Zellen und B220⁺CD43⁻ pre-B-Zellen innerhalb des Knochenmarks durch die Überaktivierung des Hh-Signalweges nicht beeinflusst wurden. Die hier gezeigten Ergebnisse der CD19-Cre- und Vav-iCre-vermittelten Manipulation sprechen ebenfalls dafür, dass die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark durch die Überaktivierung des Hh-Signalweges unbeeinflusst bleibt. Die vorliegende Arbeit beschreibt, dass ein Effekt, verursacht durch die Expression von SmoM2 auch bei der Differenzierung der B-Zellsubtypen, den transitionalen und follikulären B-Zellen, innerhalb der Milz ausbleibt. Diese Daten stehen im Widerspruch zu adenoviralen Ihh-Überexpressionsversuchen, die zu einer Expansion von follikulären B-Zellen innerhalb der Milz geführt haben (Kobune et al., 2008). Jedoch ist zu berücksichtigen, dass in dem adenoviralen Ihh-Modell die Ihh-Überexpression auch nicht-hämatopoetische Milzstromazellen beeinflusst haben könnte. Diese Ihh-beeinflussten Milzstromazellen könnten wiederum die beschriebene follikuläre B-Zellexpansion verursacht haben. Im Gegensatz zu dem adenoviralen System konnte mit Hilfe des CD19-Cre;R26^{SmoM2}-Systems eine Hh-Signalweg-überaktivierung ausschließlich in B-Zellen hervorgerufen werden.

Insbesondere ist hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit eine Verdopplung der Antikörper-produzierenden Plasmazellen innerhalb des Knochenmarks durch die CD19-Cre-vermittelte Aktivierung des R26^{SmoM2}-Allels zu verzeichnen war. Dies bedeutet, dass eine Überaktivierung des Hh-Signalweges in Plasmazellen zu einer Expansion von Plasmazellen führt. Inwiefern diese Expansion möglicherweise klonalen Ursprungs war, wurde nicht untersucht. Dieses Ergebnis ist insbesondere im Hinblick auf die Daten von Peacock *et al.* (Peacock et al., 2007) bemerkenswert, da diese Arbeitsgruppe beschreibt, dass die Tumorstammzellen des multiplen Myeloms möglicherweise durch den Hh-Signalweg erhalten werden. In Zusammenschau mit diesen Daten könnte die hier beschriebene Plasmazellexpansion durch die Überaktivierung des Hh-Signalweges dafür sprechen, dass diese aberrante Aktivierung ein frühes Ereignis in der Entstehung eines multiplen Myeloms darstellt. Die hier beschriebene

Plasmazelleexpansion ging nicht mit einer Zunahme der IgG2a-Konzentration im Blutserum der Tiere einher. Es ist jedoch möglich, dass die expandierten Plasmazellen, wie erwähnt, klonal sind und einen anderen Immunglobulin-Subtyp produzieren.

In einem weiteren Hh-Überaktivierungsmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob überexprimiertes Ihh die B-Zellentwicklung in wachsenden Knochen beeinflussen kann. Hierfür wurde das bigene Col2-Gal4;UAS-Ihh-System verwendet, das clhh in unreifen Chondrozyten in sich entwickelnden Knochen überexprimiert. Aufgrund der direkt benachbarten Lokalisation von Chondrozyten und Knochenmarkhöhle war die Arbeitshypothese, dass überexprimiertes chondrales clhh möglicherweise innerhalb der Knochenmarkhöhle befindliche unreife B-Zellen beeinflussen kann. Aus genannten Gründen beschränkte sich die Untersuchungen des Col2-Gal4;UAS-Ihh-Systems auf die Pränatalperiode.

An Tag E18,5 konnte die Besiedlung der Knochen der Col2-Gal4;UAS-Ihh-Embryonen und den Wildtyp-Kontrolltieren durch hämatopoetische Zellen nachgewiesen werden. Insbesondere konnte hier gezeigt werden, dass die Ihh-Überexpression in heranwachsenden Gliedmaßen die Entwicklung früher B-Zellprogenitorzellen nicht beeinflusst. Die durchflusszytometrischen Analysen der B-Zellvorläufer der fötalen E18,5 Col2-Gal4;UAS-Ihh-Leber und Milz ergaben im Vergleich zu denen der Wildtyp-Kontrolltiere ebenfalls keine quantitativen Unterschiede. Dementsprechend scheint die Ihh-Überexpression im Knochen der Embryonen keinen Einfluss auf die B-Zelldifferenzierung der eingewanderten Progenitoren auszuüben. Diese Daten stehen im Einklang mit adenoviralen Ihh-Überexpressionsversuchen, die ebenfalls darauf schliessen liessen, dass eine Ihh-Überexpression die frühe Entwicklung von B-Zellen innerhalb des Knochenmarks nicht beeinträchtigt (Kobune et al., 2008).

Die Daten von Sacedon *et al.* ließen auf den Einfluss des Hh-Signalweges in der peripheren B-Zelldifferenzierung schließen. Es wurde gezeigt, dass Shh als ein Überlebenssignal fungiert, das von follikulären dendritischen Zellen produziert wird und die Keimzentrums-B-Zellen vor Apoptose schützen kann (Sacedon et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit hatten die Deletion des Smo-Proteins und die Expression des SmoM2-Rezeptors keinen Effekt auf die Anzahl follikulärer und Marginalzonen-B-Zellen. Die Untersuchungen an Keimzentrums-B-Zellen von Sacedon *et al.* wurden *in vitro* durchgeführt, was die Diskrepanz zu den hier

beschriebenen *in-vivo*-Ergebnissen erklären könnte. Möglicherweise wird die Funktion des Hh-Signalweges durch synergistische Funktionen anderer Signalwege *in vivo* maskiert. Ein Beispiel für die Interaktion morphogener Signalwege ist die des Hh- und Wnt-Signalweges (Mak et al., 2006). Die potentielle Redundanz oder die Existenz anderer Signalwege, die den Verlust oder die Hyperaktivierung des Hh-Signalweges kompensieren, könnten möglicherweise die beschriebenen *in-vivo*-Ergebnisse erklären.

Smo-Manipulation innerhalb der T-Lymphopoese

Die Entwicklung von T-Zellen findet in einem eigenständigen Organ, dem Thymus statt. Hämatopoetische Progenitoren wandern in den Thymus ein und erhalten dort ein extrinsisches Signal von spezialisierten Thymusepithelzellen, das die Linienentscheidung in Richtung T-Zellen beeinflusst. Der zentrale Ligand, der diese Linien-determinierende Funktion von Thymusepithelien vermittelt, ist Delta-like 4. Das Delta-like 4-Signal der Thymusepithelien wird von NOTCH1-Rezeptoren auf hämatopoetischen Vorläuferzellen erkannt und die T-Zellentwicklung wird initiiert (Koch et al., 2008).

Für eine Funktion des Smo-Rezeptors innerhalb früher T-Zellprogenitoren sprechen mehrere Studien mit transgenen Mäusen. Die Ick-Cre- und Mx1-Cre-vermittelte Deletion von Smo innerhalb von T-Zellprogenitoren führte zu einer massiven Beeinträchtigung der normalen T-Zelldifferenzierung (Crompton et al., 2007; El Andaloussi et al., 2006). Jedoch sprechen adoptive Transferstudien, die mit *Ptch-knockout*-Knochenmark durchgeführt wurden, dafür, dass der Hh-Signalweg innerhalb des Thymusstromas, vermutlich in Thymusepithelzellen, eine zentrale Rolle für den normalen Ablauf der T-Zellentwicklung spielt (Siggins et al., 2009). Weiterhin wird Smo innerhalb von Thymusepithelzellen verhältnismäßig hoch exprimiert (Sacedon et al., 2003). Da auch in anderen Zellsystemen und insbesondere innerhalb von Malignomen die supportive Funktion des Stromas über den Hh-Signalweg vermittelt wird (Yauch et al., 2008), wurde innerhalb dieser Arbeit die Frage gestellt, ob möglicherweise die supportive Funktion des Thymusepithels für die T-Lymphopoese von dem Hh-Signalweg abhängig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde das konditionale Smo-*knockout*- ($\text{Smo}^{\text{loxP/Null}}$) und das Smo-Überaktivierungsmodell ($\text{R26}^{\text{SmoM2}}$) mit dem Hämatopoese-

spezifischen Vav-iCre- bzw. dem Thymusepithel-spezifischen Foxn1-Cre-Transgen verkreuzt. Hierdurch konnten jeweils die Folgen eines Smo-Verlustes bzw. einer Smo-Überaktivierung innerhalb sich entwickelnder T-Zellen und unabhängig davon auch innerhalb von Thymusepithelzellen untersucht werden.

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Arbeiten (Crompton et al., 2007; El Andaloussi et al., 2006) verlief die T-Zellentwicklung innerhalb des Thymus (hier vermittelt durch Vav-iCre) im Vergleich zu den Kontrolltieren identisch. Eine normal ablaufende T-Lymphopoese, trotz genetischer Abwesenheit von Smo, wurde kürzlich ebenfalls durch die Versuche von zwei weiteren Arbeitsgruppen (Smo-Verlust Mx1-Cre vermittelt) bestätigt (Hofmann et al., 2009; Gao et al., 2009). Die gegensätzlichen Ergebnisse bezüglich des T-Zell-spezifischen Smo-Verlustes sind am ehesten durch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Mx1-Cre-Induktion und durch die verschiedenen genetischen Maushintergründe zu erklären. Die vorliegende Arbeit ist die einzige Arbeit, die bisher die T-Lymphopoese nach Vav-iCre-vermittelter Smo-Deletion untersucht hat. Hervorzuheben ist auch, dass die Vav-iCre-vermittelte Hh-Überaktivierung in der vorliegenden Arbeit zu keinen Veränderungen innerhalb der T-Zellentwicklung führte.

Ebenso führte der Verlust von Smo innerhalb von Thymusepithelzellen zu keiner Beeinträchtigung der T-Lymphopoese unterstützenden Funktion dieser Zellen. Die Abwesenheit von Smo innerhalb von Thymusepithelien hatte keine Auswirkungen auf den Ablauf der T-Zellentwicklung. Durch die Thymusepithel-spezifische Hh-Überaktivierung ließ sich eine eindeutige Hochregulation von Hh-Zielgenen innerhalb des Thymusstromas nachweisen. Dennoch war die T-Zellentwicklung durch die Thymusepithel-spezifische Hh-Überaktivierung größtenteils unverändert. Es zeigte sich jedoch eine minimale Expansion von DN4-Thymozyten. Diese Zellen weisen ein hohes NOTCH1-Expressionsniveau auf. Deshalb könnte man postulieren, dass die Überaktivierung von Hh in Thymusepithelien eine gesteigert Delta-like 4-Expression innerhalb dieser Zellen bewirkt, die wiederum über NOTCH1 eine Expansion von DN1-Zellen vermittelt.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit dafür sprechen, dass die T-Zellentwicklung innerhalb des Thymus unabhängig von Smo verläuft. Insbesondere erscheint auch die supportive Funktion von Thymusepithelzellen im

Rahmen der T-Lymphopoese nicht von der Abwesenheit von Smo innerhalb dieser Zellen beeinträchtigt zu sein.

4.4 Einfluss der genetischen Smo-Manipulation auf myeloische Zellen

Effekt der genetischen Smo-Manipulation auf die Erythropoese

Die Erythropoese verläuft über mehrere Zwischenstufen, die durch unterschiedliche Untersuchungsmethoden erfasst werden. Eine frühe Vorläuferzelle, deren Potenzial bereits ausschließlich auf die Megakaryopoese und Erythropoese beschränkt ist, stellt der megakaryo-erythrozytäre Progenitor (MEP) dar, der durch Oberflächenmarker durchflusszytometrisch definiert wird. Nachfolgende frühe Differenzierungsstufen der Erythropoese sind funktionell durch die Ausbildung bestimmter Kolonien *in vitro* charakterisiert. Dies sind die BFU-E und CFU-E Kolonie-bildenden erythrozytären Progenitorzellen. Die weitere Differenzierung in der Erythropoese kann zytomorphologisch oder durchflusszytometrisch über die Oberflächenmarker CD71 und Ter119 bis zur Enukleation und Entstehung des reifen Erythrozyten verfolgt werden.

Eine mögliche Funktion des Hh-Signalweges innerhalb der Erythropoese wurde bisher hauptsächlich *in vitro* untersucht. Diese Studien untersuchten den Einfluss der pharmakologischen Inhibition des Hh-Signalweges und der Liganden-Inkubation auf die Kolonie-bildende Funktion von Knochenmarkzellen und kamen zu dem Ergebnis, dass der Hh-Signalweg einen positiven Effekt auf die Kolonie-Bildung und Proliferationseigenschaften unreifer erythrozytärer Zellen hat (Detmer et al., 2000; Detmer et al., 2005). Eine im Jahr 2009 veröffentlichte Arbeit beschreibt, dass der Hh-Signalweg in der Maus eine Rolle bei der Induktion von sogenannten erythrozytären Stress-Progenitoren in der Milz spielt, die vor allem bei einer akuten Anämie von Bedeutung sind (Perry et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Erythropoese in Homöostase *in vivo* bei genetisch Smo-manipulierten Mäusen untersucht. Sowohl der genetische Smo-Verlust als auch die genetische Smo-Überaktivierung hatten keinen Einfluss auf die Größe der MEP-Population und das Vorhandensein von BFU-E und CFU-E Kolonie-bildenden Zellen im Knochenmark. Auch die durchflusszytometrische Erfassung der terminalen erythrozytären Differenzierung ergab keine

Veränderungen durch einen genetischen Smo-Verlust. Im Gegensatz dazu zeigte diese Analyse sowohl beim durch SCL-Cre-ER^T- und auch Vav-iCre-vermittelten Smo-Überaktivierungsmodell eine Expansion der Ter119-exprimierenden Erythroblasten. Diese im Knochenmark detektierte Expansion setzte sich jedoch nicht in einer signifikanten Expansion der peripheren Erythrozytenzahlen bei diesen Mäusen fort. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass Smo-überaktivierte Retikulozyten aus unbekannten Gründen weniger effizient aus dem Knochenmark in das periphere Blut übertreten.

Smo-Manipulation innerhalb granulo-monozytärer Vorläuferzellen

Die Entwicklung von Granulozyten und Monozyten verläuft innerhalb des Knochenmarks gemeinsam bis zum granulo-monozytären Vorläufer (GMP). Wie innerhalb der Erythropoese kann die Progenitorfunktion von granulo-monozytären Zellen über die Koloniebildung (CFU-GM, CFU-M, und CFU-G) untersucht werden. Im Laufe ihrer weiteren Reifung steigern die Vorläufer der Granulozyten und Monozyten die Expression der Oberflächenmarker Mac-1 und Gr-1.

Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass die genetische Smo-Manipulation innerhalb von Mäusen die Entstehung und den Erhalt von GMP nicht beeinflusst. Weiterhin ergab sich zwischen hämatopoetischen Smo-*knockout*- und Kontrollmäusen kein Unterschied bezüglich der Gr-1⁺Mac-1⁺ Progenitoren im Knochenmark. Zusätzlich wurde die granulo-monozytäre Kolonie-Bildung durch eine Smo-Überaktivierung nicht verändert. Diese Daten stehen in Einklang mit der Arbeit von Hofmann *et al.*, die normale Mac-1⁺ Progenitoren von induzierten Mx1-Cre-vermittelten Smo-*knockout*-Tieren beschreibt (Hofmann *et al.*, 2009). Wie in der vorliegenden Arbeit schildern auch Gao *et al.* unveränderte Kolonie-bildende Progenitoren durch die Überaktivierung des Hh-Signalweges in Knochenmarkszellen (Gao *et al.*, 2009). Im Widerspruch zu diesen Daten stehen Untersuchungen von Merchant *et al.*, die bei konstitutiven Gli1-*knockout*-Mäusen defiziente granulozytäre Progenitoren mit eingeschränkter Fähigkeit zur Koloniebildung und vermindertem Ansprechen auf den G-CSF (engl.: *granulocyte-colony stimulating factor*) ergaben (Merchant *et al.*, 2010). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Aktivität von Gli1 in einigen zellulären Systemen unabhängig von Smo reguliert werden kann (Noubissi *et al.*, 2009; Nolan-Steva

et al., 2009; Beauchamp et al., 2009). Möglicherweise wird Gli1 auch innerhalb von myeloischen Zellen direkt durch Regulatoren beeinflusst, die nicht dem kanonischen Hh-Signalweg angehören.

4.5 Funktionelle Abhängigkeit des Hh-Signalweges vom primären Zilium

Die primäre Zilie ist eine immotile einzelne Organelle auf der Oberfläche beinahe aller vertebrater Zellen. Dieses Organell ist an unterschiedlichen Signalwegen, wie dem Hh- oder Wnt-Signalweg, direkt beteiligt (Berbari et al., 2009). Für die zelluläre Weiterleitung des Hh-Signals ist das primäre Zilium essentiell. Transgene *knockout*-Modelle für Komponenten des primären Ziliums zeigten vergleichbare Phänotypen wie Shh, Ihh und Smo Mausmutanten (Caspary et al., 2007; Cortellino et al., 2009; Hoover et al., 2008; Huangfu et al., 2003). Weiterhin ist ohne die Anwesenheit des primären Ziliums die Aktivierung des Signalweges auch mit Hilfe des mutierten Smo-Moleküls SmoM2 nicht möglich (Corbit et al., 2005). Folgedessen konnte die Entstehung von SmoM2-induzierten Basaliomen und Medulloblastomen durch die genetische Ausschaltung der essentiellen Zilienproteine IFT88 und Kif3a unterdrückt werden (Han et al., 2009; Wong et al., 2009).

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Unabhängigkeit der Hämatopoese vom Hh-Signalweg, stellt sich die Frage, ob diese Unabhängigkeit nicht möglicherweise schon durch die fehlende zelluläre Struktur eines primären Ziliums auf hämatopoetischen Zellen begründet sein könnte. Ein detaillierter Nachweis des primären Ziliums auf hämatopoetischen Zellen ist nach eigener Literaturrecherche bis heute nicht erbracht worden (Wheatley, 1995). Sollten primäre Zilien auf hämatopoetischen Zellen fehlen, wäre dies eine Erklärungsmöglichkeit für den mangelnden Einfluss des Hh-Signalweges auf die Hämatopoese. Bei der Abwesenheit des primären Ziliums würde selbst die Überexpression des Smo-Rezeptors keine intrazelluläre Weiterleitung des Hh-Signales bewirken. Bei einem vollständigen Fehlen des primären Ziliums auf hämatopoetischen Zellen wäre jedoch unklar, warum eine Überaktivierung des Hh-Signalweges, vermittelt durch die Expression des SmoM2-Proteins, eine Expansion von erythrozytären Vorläufern und Plasmazellen im Knochenmark bewirkt. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die erythrozytären

Zellen und Plasmazellen alternative Wege zur Aktivierung des Hh-Signalweges nutzen oder doch in der Lage sind, das primäre Zilium auszubilden.

Für die Fähigkeit zur Ausbildung eines primären Ziliums von Stammzellen spricht die Studie von Kiprilov *et al.*, die primäre Zilien auf humanen embryonalen Stammzellen zeigte. Demzufolge ist die Ausbildung eines primären Ziliums mit der Selbsterneuerungsfähigkeit von Stammzellen durchaus vereinbar (Kiprilov *et al.*, 2008)

Solange die Biologie der primären Zilie innerhalb hämatopoetischer Zellen unerforscht ist, wird die Frage unbeantwortet bleiben, inwiefern die strukturelle Vorraussetzung für den Hh-Signalweg in Form von primären Zilien ursächlich für die erhobenen Daten dieser Arbeit sind.

Zusammenfassend zeigen die genetischen *in-vivo*-Experimente dieser Arbeit, dass die adulte Hämatopoese im normalen Zustand unabhängig von der Hh-Signaltransduktion über den Smo-Rezeptor ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine hämatopoetische Smo-Überaktivierung *in vivo* zu einer expandierten terminalen Erythropoese und dem gesteigerten Vorkommen von Plasmazellen im Knochenmark führt. Ferner führte eine Smo-Überaktivierung im Thymusstroma zu einer Expansion von frühen T-Zellprogenitoren.

Die Unabhängigkeit der Hämatopoese vom Smo-Rezeptor bedeutet, dass bei der Therapie von soliden Tumoren mit Hh-Antagonisten keine ausgeprägte Hämatotoxizität zu erwarten ist.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Smo-Inaktivierung keinen Einfluss auf normale hämatopoetische Stammzellen, Progenitoren und terminal ausreifende Blutzellen *in vivo* hat. Es existieren jedoch Hinweise, dass der Hh-Signalweg die Expansion, den Erhalt und das Überleben maligner Zellpopulationen unterstützt, die ihren Ursprung in einer hämatopoetischen Zelllinie haben. Im Rahmen der Untersuchungen maligner Lymphome und Plasmazytome sowie LSC (engl.: *leukemic stem cell*) der CML (engl.: *chronic myeloid leukemia*) (Dierks et al., 2007; Dierks et al., 2008) konnte eine Abhängigkeit der malignen Zellen von Hh-Signalen beobachtet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges zu einer Expansion der Gesamtzellzahl des Knochenmarks und insbesondere zu einer Expansion reifer Plasmazellen führte. Diese Beobachtung wird insbesondere in Anbetracht der Daten von Peacock *et al.* relevant, (Peacock et al., 2007), die dafür sprechen, dass insbesondere die Tumorstammzellpopulation innerhalb eines multiplen Myeloms abhängig vom Hh-Signalweg ist. In Zusammenschau könnte diese Beobachtung bedeuten, dass eine Aktivierung des Hh-Signalweges ein frühes Ereignis bei der Entstehung eines multiplen Myeloms darstellt. Die genauen Mechanismen der Signalweg-Aktivierung innerhalb von Myelomzellen sind unbekannt.

Ein weiterführender Versuch, der auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufbaut, wäre zunächst CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Mäuse und Kontrollen für eine längere Zeit zu beobachten, um zu untersuchen, ob diese Mäuse möglicherweise spontan an einem multiplen Myelom erkranken. Zusätzlich sollte unbedingt untersucht werden, ob die in dieser Arbeit beobachtete Plasmazellexpansion monoklonal oder polyklonal ist.

Insbesondere sollte die Kombination des CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Modells, bei dem die Plasmazellexpansion nachgewiesen wurde, mit einem transgenen multiplen Myelom-Mausmodell erfolgen, um zu untersuchen ob eine Hh-Signalweg-Überaktivierung die Entstehung eines multiplen Myeloms akzellerieren kann. Es existiert ein transgenes multiples Myelom-Mausmodell, das vom E μ -Promotor gesteuert, eine Isoform des Transkriptionsfaktors XBP-1s exprimiert (Carrasco et al., 2007). Diese Mäuse beginnen nach etwa 10 Monaten an einem

Plasmazellmalignom zu versterben. Die maligne Erkrankung dieser Mäuse beinhaltet den Symptomkomplex der monoklonalen Hypergammaglobulinämie, Niereninsuffizienz und Osteolysen. Diese Charakteristika sind typisch für die humane Myelomerkrankung. Wenn der Hh-Signalweg eine funktionelle Rolle bei der Entstehung eines multiplen Myeloms hat, sollte das CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}-Modell mit dem Eμ- XBP-1s Transgen kooperieren und das Auftreten eines Myeloms beschleunigen. Des Weiteren könnte der Effekt einer pharmakologischen Hh-Signalweg-Inhibition in diesem Modell klären, ob die Hh-Aktivierung auch nach Etablierung eines Myeloms eine Rolle für den Erhalt des malignen Phänotyps spielt. Möglicherweise kommt es durch eine Hh-Inhibition zu einer Regression der Myelomerkrankung. Diese Daten könnten die Rationale für eine Hh-Inhibition als neuen therapeutischen Ansatz beim multiplen Myelom bilden.

6. Zusammenfassung

Mehrere Untersuchungen ließen auf eine wichtige Rolle des Hedgehog (Hh)-Signalweges für die Funktion hämatopoetischer Stammzellen und deren Differenzierung in reife Blut- und Immunzellen schließen. Innerhalb des Hh-Signalweges stellt der Smoothed (Smo)-Rezeptor die einzige nicht redundante Komponente dar. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die hämatopoetische Rolle des Hh-Signalweges mit Hilfe von konditional Smo-defizienten und Smo-überaktivierten Mausmutanten untersucht. Zunächst wurde mit Hilfe von PCR Analysen nachgewiesen, dass die genetische Smo-Inaktivierung bzw. Smo-Aktivierung innerhalb hämatopoetischer Zellen dieser Mausmodelle erfolgreich war. Das äußerliche Erscheinungsbild der Mäuse mit hämatopoetischer Smo-Inaktivierung bot keinen Anhalt für das Vorliegen einer Anämie oder eines Immundefektes. Überraschenderweise zeigten auch die durchflusszytometrischen Analysen, dass hämatopoetische Stammzell- und Progenitorsubpopulationen durch die konditionale Smo-Inaktivierung nicht beeinträchtigt waren. Ebenso hatte die Smo-Inaktivierung keinen Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung von B- und T-Zellen. Dagegen verdoppelte sich die Anzahl von Plasmazellen im Knochenmark bei Mäusen mit B-Zell-spezifischer Smo-Überaktivierung. Auch erythrozytäre Vorläuferzellen expandierten im Knochenmark von Mäusen mit hämatopoetischer Smo-Überaktivierung. Diese erythrozytäre Progenitorexpansion ging jedoch nicht mit erhöhten Erythrozytenzahlen im peripheren Blut dieser Mäuse einher. Eine spezifische Smo-Überaktivierung innerhalb des Thymusstromas führte zu einer Expansion von unreifen T-Zellvorläufern, die das Rearrangement der β -Kette des T-Zellrezeptors erfolgreich durchlaufen hatten. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der Smo-Inaktivierungsversuche gegen eine zentrale Bedeutung des Hh-Signalweges innerhalb der Hämatopoese. Dies bedeutet, dass bei Therapien von soliden Tumoren mit Hh-Inhibitoren keine hämatologischen Nebenwirkungen zu erwarten sind. Weiterhin spricht die Plasmazellexpansion, die durch die Smo-Überaktivierung verursacht wurde, für eine mögliche Rolle des Hh-Signalweges bei der Entstehung eines multiplen Myeloms.

7. Anhang

Tab.7.1: Mausstämme

Stamm	Kurzbez.	Funktion/ Spezifität	Referenz
129X1-Smoh ^{tm1Amc}	Smo ^{Null}	Smo- <i>knockout</i> Allel	(Zhang et al., 2001)
STOCK Smoh ^{tm2Amc}	Smo ^{loxP}	konditionales Smo-Allel	(Long et al., 2001)
Gt(ROSA)26 Sor ^{tm1(Smo/YFP)Amc}	R26 ^{SmoM2}	konditionales Smo- Überaktivierungsallel	(Jeong et al., 2004)
Gt(ROSA)26 Sor ^{tm1(EYFP)Cos}	R26 ^{EYFP}	konditionale Cre-abhängige EYFP-Expression	(Soriano, 1999)
HSC-SCL-Cre-ER ^I	SCL-Cre-ER ^I	TAM-induzierbare Cre-Rekombination in HSC & Progenitoren	(Gothert et al., 2005)
B6.Cg-Tg(Vav1-cre) A2Kio	Vav-iCre	Cre-Rekombination im hämatopoetischen System	(de Boer et al., 2003)
C.129P2- Cd19 ^{tm1(cre)Cgn}	CD19-Cre	Cre-Rekombination in reifen B-Zellen	(Rickert et al., 1995)
Foxn1 ^{ex9cre}	Foxn1-Cre	Cre-Rekombination in Thymusepithelzellen	(Gordon et al., 2007)
Col2-Gal4; UAS-Ihh	Col2-Gal4; UAS-Ihh	clhh-Überexpression in Chondrozyten	(Long et al., 2001)

Tab.7.2: Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Zielsequenz
#68	wt_SCL_700bp_B_fw	AGC ATG CTC TTT TCC AGC AT	SCL-Lokus
#69	wt_SCL_700bp_B_rv	CTC AGG CTG GCC TAA AAC TG	SCL-Lokus
#1	Creframpton_fwd ^{*1}	TCG ATG CAA CGA GTG ATG AG	Cre-Rekombinase
#2	Creframpton_rev ^{*1}	TTC GGC TAT ACG TAA CAG GG	Cre-Rekombinase
#186	mVav1.2 ^{*2}	GTC ACA AAA GAG GAA GTG GTG	Vav-iCre-Transgen
#187	Cre11 ^{*2}	TCC CTG AAC ATG TCC ATC AGG	Vav-iCre-Transgen
#188	mFas1 ^{*2}	TCC CTT AAA CAG CAG TGC TGT	Fas-Lokus
#189	mFas3 ^{*2}	TAG CAA ATC TAG GCA TTA ACA GTG	Fas-Lokus
#109	Neo_PolyA_fw	GCC TGA AGA ACG AGA TCA GC	NEO ^R -Kassette
#110	Intron_1_rv	TAC TCG GGC TCT TTG TGA CC	Smo Intron 1
#204	SmoNCS3_fwd	GGC TGG GAG TCG GTT TTA AT	Smo noncoding-sequence (Ex 1)
#205	MAPT1_rev	GTC TTC CAG GTT GGA CGT GT	Smo ^{loxP} -Allel
#210	Neo3_fwd	TCT GGA TTC ATC GAC TGT GG	NEO ^R -Kassette
#12	ROSA_rep_161 ^{*3}	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT	R26 ^{wt} -Allel
#13	ROSA_rep_162 ^{*3}	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC	R26- <i>knockin</i> -Allel
#14	ROSA_rep_163 ^{*3}	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG	R26 ^{wt} -Allel

^{*1} entworfen von Jonathan Frampton

^{*2} entworfen von Ralf Waldschütz

^{*3} (Soriano, 1999)

^{*4} entworfen von Ernst-Otto Bockamp

Tab.7.3: Primer zum Nachweis der Cre-abhängigen Rekombination

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Zielsequenz
#204	SmoNCS3_fwd	GGC TGG GAG TCG GTT TTA AT	Smo noncoding sequence (Ex 1)
#205	MAPT1_rev	GTC TTC CAG GTT GGA CGT GT	Smo ^{loxP} -Allel
#181	SmoEx1d_rev	CCA GCA GCC ATG GTA TCG	Smo Exon 1
#110	Intron_1_rv	TAC TCG GGC TCT TTG TGA CC	Smo Intron 1
#210	Neo3_fwd	TCT GGA TTC ATC GAC TGT GG	NEO ^R -Kassette
#156	SA(ROSA)b_fwd	GGA TCT GTA GGG CGC AGT AG	R26-knockin-Allel <i>splice acceptor</i>

Tab.7.4: Primer für die verwendeten Expressionsanalysen

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Zielsequenz
#17	hppt_f* ¹	TCG TGA TTA GCG ATG ATG AAC C	HPRT
#18	hppt_r* ¹	CTG GCA ACA TCA ACA GGA CTC C	HPRT
#146	SmoEx1c_fwd	AGC CTT TGC GCT ACA ACG	Smo Exon 1
#147	SmoEx2e_rev	TCG GTC ATT CTC ACA CTT GG	Smo Exon 2
#183	SmoEx9_fwd	TTG TGC TCA TCA CCT TCA GC	Smo Exon 9
#184	SmoM2_rev	GGT GGC CTT GGT CCA GAC CA	SmoM2
#33	mu_smo_f	CAT CAA GTT CAA CAG CTC AGG C	Smo Exon 11
#34	mu_smo_r	ATA GGT GAG GAC CAC GAA CCA GAC TAC TCC	Smo Exon 12
#37	mu_ptch_saced_f* ²	TGG CCT GCA CGT TTC TAG TG	Ptch
#38	mu_ptch_saced_r* ²	GCC AGG ACG GCA AAG AAG TA	Ptch
#179	muGli1_fwd* ³	TGT GGC GAA TAG ACA GAG GT	Gli1
#180	muGli1_rev* ³	TGC CAG ATA TGC TTC AGC CA	Gli1
#39	mu_smo_saced_f* ²	CCC CAG GAT GTG TCC GTT AC	Smo Exon 11
#40	mu_smo_saced_r* ²	GGC AGA AGG GGT TGG AGA CTA	Smo Exon 12

*¹ (Outram et al., 2000)*² (Sacedon et al., 2005)*³ (Dierks et al., 2007)

Tab.7.5: TaqMan® Assays (Applied Biosystems) zum Nachweis der Hh-Zielgene und Smo

Gen	Gen Symbol	Assay Identification	Exon
Patched1	Ptch1	Mm00436031_m1	22.-23.
Smoothened homolog (Drosophila)	Smo	Mm01162705_m1	2.-3.
bone morphogenetic protein	Bmp4	Mm00432087_m1	3.-4.
GLI-Kruppel familiy member GLI1	Gli1	Mm00494654_m1	11.-12.
GLI-Kruppel familiy member GLI1	Gli1	Mm00494645_m1	2.-3.
GLI-Kruppel familiy member GLI2	Gli2	Mm01293117_m1	8-9
GLI-Kruppel familiy member GLI3	Gli3	Mm00492345_m1	14-15

Tab.7.6: Antikörper, Isotypenkontrollen, *Blocking*-Reagenzien

Antikörper (α-)	Klon	Anbieter
AA4.1	AA4.1	eBioscience
BP-1(Ly-51)	BP-1	BD Pharmingen
CD11c	N418	eBioscience
CD123/IL3Rα	5B11	BD Pharmingen
CD127/IL7Rα	A7R34	BD Pharmingen
CD138	281-2	BD Pharmingen
CD16/CD32	2.4G2	BD Pharmingen
CD19	1D3	BD Pharmingen
CD21/CD35	7G6	BD Pharmingen
CD23	B3B4	BD Pharmingen
CD24	M1/69	BD Pharmingen
CD25	PC61.5	eBioscience
CD28	37.51	BD Pharmingen
CD34	RAM34	eBioscience
CD3e	145-2C11	BD Pharmingen
CD4	RM4-5	BD Pharmingen
CD41	MWReg30	BD Pharmingen
CD43	S7	BD Pharmingen
CD44	IM7	BD Pharmingen
CD45R/B220	RA3-6B2	BD Pharmingen/eBioscience

CD71	C2(C2F2)	BD Pharmingen
CD8a	53-6.7	BD Pharmingen
CD9	eBioKMC8	eBioscience
c-kit	2B8	BD Pharmingen/Caltag Laboratories
F4/80	Cl:A3-1	AbD SeroTec
Flk-2/Flt3	A2F10.1	BD Pharmingen
GFP	FM264G	BioLegend
Gr-1	RB6-8C5	BD Pharmingen
IgD	11-26c.2a	BD Pharmingen
IgM	ILL41	eBioscience
Mac-1	M1/70	BD Pharmingen
Nk1.1	PK136	BD Pharmingen
Sca-1	D7	BD Pharmingen
TCR β	H57-597	BD Pharmingen/eBioscience
Ter119	TER119	BD Pharmingen
<i>goat</i> α -Smo	polyklonal	Santa Cruz Technologies
<i>donkey</i> α - <i>goat</i>	polyklonal	Santa Cruz Technologies
Isotypenkontrollen		
Rat IgG2a, κ	R35-95	BD Pharmingen
Rat (LOU)IgG2b, κ	A95-1	BD Pharmingen
α - <i>goat</i> -IgG	polyklonal	Santa Cruz Technologies
Blocking Reagenz		
α -CD16/CD32 (<i>mouse</i>)	2.4G2	BD Pharmingen
<i>donkey</i> Serum	polyklonal	Sigma [®]

Tab.7.7: Fluorochromkonjugate und Metabolit-Fluorochrome

Fluorochromkonjugate für biotinilierte Antikörper	Anbieter
Streptavidin(SAV)-Allophycocyanin (APC)	BD Pharmingen
SAV-Fluoresceinisoithiocyanat (FITC)	BD Pharmingen
SAV-Phycoerythrine(PE)	BD Pharmingen
SAV-PE-Cyanin 7 (Cy7)	BD Pharmingen
SAV-Peridinin Chlorophyllprotein(PerCP)-Cyanin 5.5 (Cy5.5)	BD Pharmingen
SAV-APC-Cy7	BD Pharmingen
Metabolit Fluorochrome	Anbieter
Propidiumiodid (PI)	Sigma [®]

4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Sigma®
---	--------

Tab.7.8: PCR-Protokoll zum Nachweis einer Sequenz des SCL-Lokus

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	15,44
20 µM	Primer #68 wt_SCL_700bp_B_fw	0,1
20 µM	Primer #69 wt_SCL_700bp_B_rv	0,1
25 mM	dNTPs	0,16
10x	Buffer	2
25 mM	MgCl ₂	1,6
5 U/µl	Taq	0,1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	15 sek.
<i>Annealing</i> *	55	15 sek.
Elongation *	72	40 sek.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		
Produktgröße: 722 bp		

Tab.7.9: PCR-Protokoll zum Nachweis einer Sequenz des Cre-Transgens

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	14,84
20 µM	Primer #1 Creframpton_fwd	0,2
20 µM	Primer #2 Creframpton_rev	0,2
25 mM	dNTPs	0,16
10x	Buffer	2
25 mM	MgCl ₂	2
5 U/µl	Taq	0,1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	30 sek.
<i>Annealing</i> *	56	50 sek.
Elongation *	72	1 min.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		
Produktgröße: ~500 bp		

Tab.7.10: PCR-Protokoll zum Nachweis einer Sequenz des Vav-iCre-Transgens

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	14,84
20 µM	Primer #186 mVav1.2	0,2
20 µM	Primer #187 Cre11	0,2
20 µM	Primer #188 mFas1	0,2
20 µM	Primer #189 mFas3	0,2
25 mM	dNTPs	0,16
10x	Buffer	2

25 mM	MgCl ₂	1,6
5 U/μl	Taq	0,1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	15 sek.
<i>Annealing</i> *	55	30 sek.
Elongation *	72	1 min.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		
Produktgröße: Vav-iCre 485 bp		
Produktgröße: Fas ~400 bp		

Tab.7.11: PCR-Protokoll zum Nachweis des transgenen und Wildtyp-R26-Allels

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (μl)
	H ₂ O	17,2
20 μM	Primer #12 ROSA_rep_161	0,6
20 μM	Primer #13 ROSA_rep_162	0,24
20 μM	Primer #14 ROSA_rep_163	0,36
25 mM	dNTPs	0,2
10x	Buffer	2,4
25 mM	MgCl ₂	2,4
5 U/μl	Taq	0,1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	30 sek.
<i>Annealing</i> *	56	50 sek.
Elongation *	72	1 min.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		

Produktgröße: R26 ^{wt} ~500 bp		
Produktgröße: tr. R26 ~250 bp		

Tab.7.12: PCR-Protokoll zum Nachweis des Smo^{Null}-Allels

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	15,44
20 µM	Primer #109 Neo_PolyA_fw	0,1
20 µM	Primer #110 Intron_1_rv	0,1
25 mM	dNTPs	0,16
10x	Buffer	2
25 mM	MgCl ₂	1,6
5 U/µl	Taq	0,1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	30 sek.
<i>Annealing</i> *	53	15 sek.
Elongation *	72	1 min.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		
Produktgröße: 344 bp		

Tab.7.13: PCR-Protokoll zum Nachweis des intakten und rekombinierten Smo^{loxP}-Allels

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	15,1
20 µM	Primer #204 SmoNCS3_fwd	0,1
20 µM	Primer #205 MAPT1_rev	0,1
20 µM	Primer #210 Neo3_fwd	0,1
25 mM	dNTPs	0,16

10x	Buffer	2
25 mM	MgCl ₂	1,2
5 U/μl	Taq	0,1
100 %	DMSO	0,8
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	40 sek.
<i>Annealing</i> *	56	60 sek.
Elongation *	72	90 sek.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		
Produktgröße: Smo ^{loxP} ~1,1 kb		
Produktgröße: rek. Smo ^{loxP} ~700 bp		

Die Amplifikation des Smo^{wt}-Allels erfolgt mit den Primern #204 SmoNCS3_fwd und #110 Intron_1_rv nach demselben Protokoll (Produktgröße: 862 bp)

Tab.7.14: PCR-Protokoll zum Nachweis des rekombinierten R26^{SmoM2}-Allels

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (μl)
	H ₂ O	14,84
20 μM	Primer #156 SA(ROSA)b_fwd	0,1
20 μM	Primer #181 SmoEx1d_rev	0,1
25 mM	dNTPs	0,16
10x	Buffer	2
50 mM	MgCl ₂	1,2
5 U/μl	Taq	0,1
100 %	DMSO	1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.

Denaturierung *	95	15 sek.
<i>Annealing</i> *	59	15 sek.
Elongation *	72	3 min.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		
Produktgröße: 245 bp		

Tab.7.15: PCR-Protokoll zum Nachweis des *Ptch*^{Null}-Allels

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	15,84
20 µM	Primer #5 LacZ3	0,2
20 µM	Primer #6 LacZ4	0,2
25 mM	dNTPs	0,16
10x	Buffer	2
50 mM	MgCl ₂	1
5 U/µl	Taq	0,1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	15 sek.
<i>Annealing</i> *	56	15 sek.
Elongation *	72	45 sek.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 35 Zyklen		
Produktgröße: 199 bp		

Tab.7.16: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis des *house keeping*-Gens HPRT

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	18,4
20 µM	Primer #17 hprt_f	0,125
20 µM	Primer #18 hprt_r	0,125
25 mM	dNTPs	0,2
10x	Buffer	2,5
50 mM	MgCl ₂	1
5 U/µl	Taq	0,15
	DNA	2,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	15 sek.
<i>Annealing</i> *	56	15 sek.
Elongation *	72	30 sek.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 33 Zyklen		
Produktgröße: 686 bp		

Tab.7.17: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis der Hh-Komponente Smo-Exon 1-2

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	15,44
20 µM	Primer #146 SmoEx1c_fwd	0,1
20 µM	Primer #147 SmoEx2e_rev	0,1
25 mM	dNTPs	0,16
10x	Buffer	2
25 mM	MgCl ₂	1,6
5 U/µl	Taq	0,1
	DNA	0,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit

Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10 min.
Denaturierung *	95	15 sek.
<i>Annealing</i> *	54	15 sek.
Elongation *	72	3 min.
finale Extension	72	3 min.
	4	∞
*= in 40 Zyklen		
Produktgröße: 166 bp		

Tab.7.18: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis der Hh-Komponente Smo-Exon 11-12

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	18,4
20 µM	Primer #39 mu_smo_saced_f	0,125
20 µM	Primer #40 mu_smo_saced_r	0,125
25 mM	dNTPs	0,2
10x	Buffer	2,5
50 mM	MgCl ₂	1
5 U/µl	Taq	0,15
	DNA	2,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	94	3 min.
Denaturierung *	94	45 sek.
<i>Annealing</i> *	61	45 sek.
Elongation *	72	45 sek.
finale Extension	72	10 min.
	4	∞
*= in 40 Zyklen		
Produktgröße: 322 bp		

Die Amplifikation des Ptch-Transkriptes erfolgt mit den Primern #37 mu_ptch_saced_f und #38 mu_ptch_saced_r nach demselben Protokoll (Produktgröße: 364 bp).

Tab.7.19: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis des Hh-Zielgens Gli1

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	18,4
20 µM	Primer #179 muGli1_fwd	0,125
20 µM	Primer #180 muGli1_rev	0,125
25 mM	dNTPs	0,2
10x	Buffer	2,5
50 mM	MgCl ₂	1
5 U/µl	Taq	0,15
	DNA	2,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	94	3 min.
Denaturierung *	94	45 sek.
<i>Annealing</i> *	55	45 sek.
Elongation *	72	45 sek.
finale Extension	72	10 min.
	4	∞
*= in 40 Zyklen		
Produktgröße: 291 bp		

Tab.7.20: RT-PCR-Protokoll zum Nachweis des SmoM2-Transkriptes

Konzentration	Komponente	Volumen für eine Probe (µl)
	H ₂ O	18,9
20 µM	Primer #183 SmoEx9_fwd	0,125
20 µM	Primer #184 SmoM2_rev	0,125
25 mM	dNTPs	0,2
10x	Buffer	2,5
50 mM	MgCl ₂	0,5
5 U/µl	Taq	0,15
	DNA	2,5
Schritte	Temperatur (°C)	Zeit

Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	94	3 min.
Denaturierung *	94	45 sek.
<i>Annealing</i> *	61	45 sek.
Elongation *	72	45 sek.
finale Extension	72	10 min.
	4	∞
*= in 40 Zyklen		
Produktgröße: 239 bp		

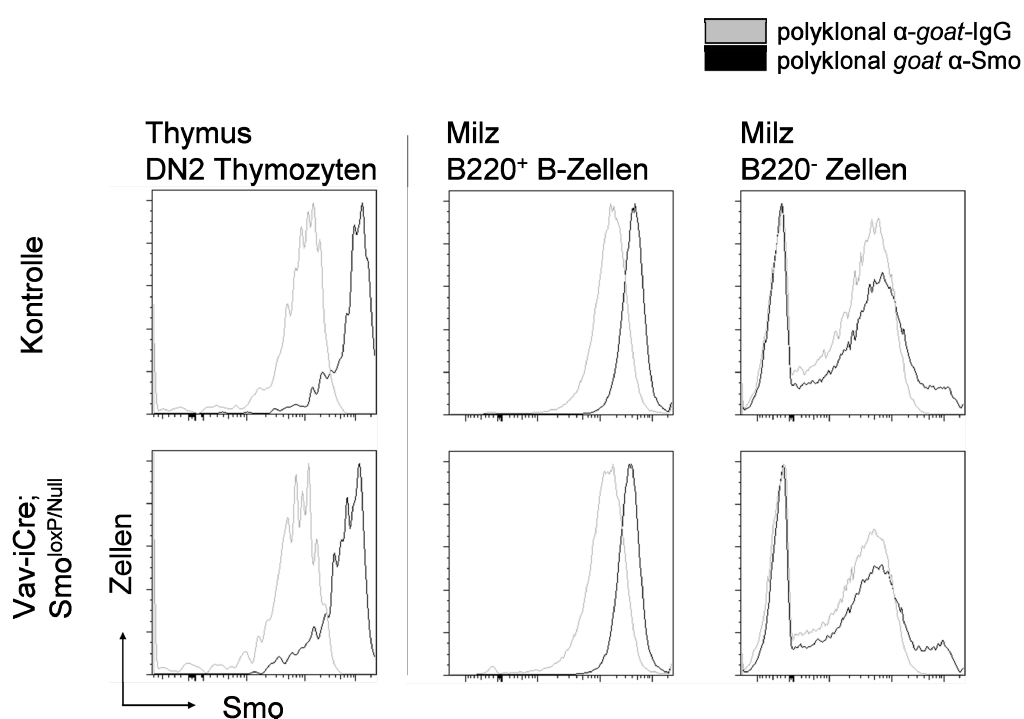


Abb.7.1: Durchflusszytometrischer Nachweis des Smo-Proteins auf DN2-Thymozyten im Thymus und B220⁺ sowie B220⁻ Zellen in der Milz einer Vav-iCre;Smo^{loxP/Null}-Maus und einer Wildtyp-Kontrolle. Der durchflusszytometrische Nachweis erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen α -Smo-Antikörpers und einer polyklonalen *goat*-Isotyp-Kontrolle.

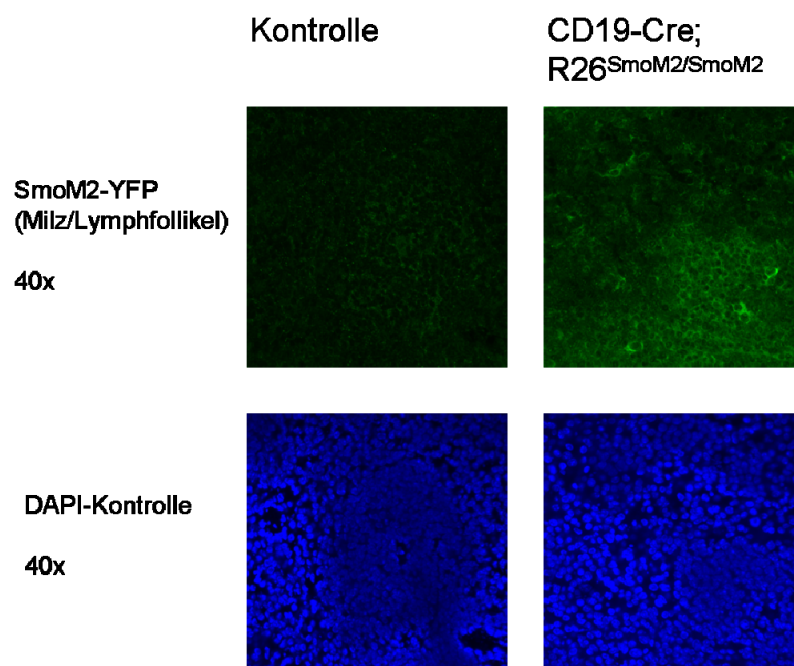


Abb.7.2: Nachweis des SmoM2-YFP-Fusionsproteins mittels LSM (engl.: *laser scanning microscopy*) in B-Lymphozyten. Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte durch einen α GFP-Antikörper, der den YFP-Anteil des SmoM2-Proteins bindet. Mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper wurde das SmoM2-Protein sichtbar. Die LSM-Aufnahmen der Milz (40x Vergrößerung) von CD19-Cre;R26^{SmoM2/SmoM2}- zeigten in den Lymphfollikeln der Milz-Zellen eine Expression des SmoM2-YFP-Fusionsproteins.

Literaturverzeichnis

- Akashi,K., He,X., Chen,J., Iwasaki,H., Niu,C., Steenhard,B., Zhang,J., Haug,J., and Li,L. (2003). Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 101, 383-389.
- Akashi,K., Traver,D., Miyamoto,T., and Weissman,I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Allman,D., Li,J., and Hardy,R.R. (1999). Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J. Exp. Med.* 189, 735-740.
- Allman,D. and Pillai,S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 149-157.
- Arai,F., Hirao,A., Ohmura,M., Sato,H., Matsuoka,S., Takubo,K., Ito,K., Koh,G.Y., and Suda,T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
- Bai,C.B. and Joyner,A.L. (2001). Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development* 128, 5161-5172.
- Ballas,Z.K. and Rasmussen,W. (1990). NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J. Immunol.* 145, 1039-1045.
- Beauchamp,E., Bulut,G., Abaan,O., Chen,K., Merchant,A., Matsui,W., Endo,Y., Rubin,J.S., Toretsky,J., and Uren,A. (2009). GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 284, 9074-9082.
- Bellantuono,I. (2004). Haemopoietic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 607-620.
- Berbari,N.F., O'Connor,A.K., Haycraft,C.J., and Yoder,B.K. (2009). The primary cilium as a complex signaling center. *Curr. Biol.* 19, R526-R535.
- Berman,D.M., Karhadkar,S.S., Hallahan,A.R., Pritchard,J.I., Eberhart,C.G., Watkins,D.N., Chen,J.K., Cooper,M.K., Taipale,J., Olson,J.M., and Beachy,P.A. (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297, 1559-1561.
- Berman,D.M., Karhadkar,S.S., Maitra,A., Montes De,O.R., Gerstenblith,M.R., Briggs,K., Parker,A.R., Shimada,Y., Eshleman,J.R., Watkins,D.N., and Beachy,P.A. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425, 846-851.
- Bhardwaj,G., Murdoch,B., Wu,D., Baker,D.P., Williams,K.P., Chadwick,K., Ling,L.E., Karanu,F.N., and Bhatia,M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2, 172-180.
- Bigelow,R.L., Chari,N.S., Unden,A.B., Spurgers,K.B., Lee,S., Roop,D.R., Toftgard,R., and McDonnell,T.J. (2004). Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J. Biol. Chem.* 279, 1197-1205.
- Bitgood,M.J., Shen,L., and McMahon,A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 6, 298-304.
- Bockamp,E., Maringer,M., Spangenberg,C., Fees,S., Fraser,S., Eshkind,L., Oesch,F., and Zabel,B. (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 11, 115-132.

- Bonifas,J.M., Pennypacker,S., Chuang,P.T., McMahon,A.P., Williams,M., Rosenthal,A., de Sauvage,F.J., and Epstein,E.H., Jr. (2001). Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J. Invest Dermatol.* **116**, 739-742.
- Bornemann,D.J., Duncan,J.E., Staatz,W., Selleck,S., and Warrior,R. (2004). Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* **131**, 1927-1938.
- Brocard,J., Warot,X., Wendling,O., Messaddeq,N., Vonesch,J.L., Chambon,P., and Metzger,D. (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14559-14563.
- Broske,A.M., Vockentanz,L., Kharazi,S., Huska,M.R., Mancini,E., Scheller,M., Kuhl,C., Enns,A., Prinz,M., Jaenisch,R., Nerlov,C., Leutz,A., Andrade-Navarro,M.A., Jacobsen,S.E., and Rosenbauer,F. (2009). DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat. Genet.* **41**, 1207-1215.
- Bryder,D., Rossi,D.J., and Weissman,I.L. (2006). Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.* **169**, 338-346.
- Byrd,N., Becker,S., Maye,P., Narasimhaiah,R., St Jacques,B., Zhang,X., McMahon,J., McMahon,A., and Gabel,L. (2002). Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development* **129**, 361-372.
- Calvi,L.M., Adams,G.B., Weibrecht,K.W., Weber,J.M., Olson,D.P., Knight,M.C., Martin,R.P., Schipani,E., Divieti,P., Bringham,F.R., Milner,L.A., Kronenberg,H.M., and Scadden,D.T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846.
- Carrasco,D.R., Sukhdeo,K., Protopopova,M., Sinha,R., Enos,M., Carrasco,D.E., Zheng,M., Mani,M., Henderson,J., Pinkus,G.S., Munshi,N., Horner,J., Ivanova,E.V., Protopopov,A., Anderson,K.C., Tonon,G., and DePinho,R.A. (2007). The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* **11**, 349-360.
- Caspary,T., Larkins,C.E., and Anderson,K.V. (2007). The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev. Cell* **12**, 767-778.
- Cesta,M.F. (2006). Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* **34**, 455-465.
- Chan,C.K., Chen,C.C., Luppen,C.A., Kim,J.B., DeBoer,A.T., Wei,K., Helms,J.A., Kuo,C.J., Kraft,D.L., and Weissman,I.L. (2009). Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* **457**, 490-494.
- Chang,D.T., Lopez,A., von Kessler,D.P., Chiang,C., Simandl,B.K., Zhao,R., Seldin,M.F., Fallon,J.F., and Beachy,P.A. (1994). Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* **120**, 3339-3353.
- Chen,J.N., van Eeden,F.J., Warren,K.S., Chin,A., Nusslein-Volhard,C., Haffter,P., and Fishman,M.C. (1997). Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* **124**, 4373-4382.
- Chen,M.J., Yokomizo,T., Zeigler,B.M., Dzierzak,E., and Speck,N.A. (2009). Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* **457**, 887-891.
- Chen,Y. and Struhl,G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553-563.
- Cheng,T., Rodrigues,N., Shen,H., Yang,Y., Dombkowski,D., Sykes,M., and Scadden,D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* **287**, 1804-1808.

- Cheung,W.C., Kim,J.S., Linden,M., Peng,L., Van Ness,B., Polakiewicz,R.D., and Janz,S. (2004). Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J. Clin. Invest* 113, 1763-1773.
- Chiang,C., Litington,Y., Lee,E., Young,K.E., Corden,J.L., Westphal,H., and Beachy,P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
- Christensen,J.L. and Weissman,I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14541-14546.
- Chuang,P.T. and McMahon,A.P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-621.
- Corbit,K.C., Aanstad,P., Singla,V., Norman,A.R., Stainier,D.Y., and Reiter,J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018-1021.
- Cortellino,S., Wang,C., Wang,B., Bassi,M.R., Caretti,E., Champeval,D., Calmont,A., Jarnik,M., Burch,J., Zaret,K.S., Larue,L., and Bellacosa,A. (2009). Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene *Ift122/Wdr10*, partially overlapping with the DNA repair gene *Med1/Mbd4*. *Dev. Biol.* 325, 225-237.
- Crompton,T., Outram,S.V., and Hager-Theodorides,A.L. (2007). Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 726-735.
- Danielian,P.S., Muccino,D., Rowitch,D.H., Michael,S.K., and McMahon,A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen- inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* 8, 1323-1326.
- de Boer,J., Williams,A., Skavdis,G., Harker,N., Coles,M., Tolaini,M., Norton,T., Williams,K., Roderick,K., Potocnik,A.J., and Kioussis,D. (2003). Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur. J. Immunol.* 33, 314-325.
- Delassus,S., Darche,S., Kourilsky,P., and Cumano,A. (1998). Ontogeny of the heavy chain immunoglobulin repertoire in fetal liver and bone marrow. *J. Immunol.* 160, 3274-3280.
- Delogu,A., Schebesta,A., Sun,Q., Aschenbrenner,K., Perlot,T., and Busslinger,M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity.* 24, 269-281.
- Detmer,K., Thompson,A.J., Garner,R.E., Walker,A.N., Gaffield,W., and Dannawi,H. (2005). Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis.* 34, 60-70.
- Detmer,K., Walker,A.N., Jenkins,T.M., Steele,T.A., and Dannawi,H. (2000). Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling. *Blood Cells Mol Dis.* 26, 360-372.
- Dierks,C., Beigi,R., Guo,G.R., Zirlik,K., Stegert,M.R., Manley,P., Trussell,C., Schmitt-Graeff,A., Landwerlin,K., Veelken,H., and Warmuth,M. (2008). Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* 14, 238-249.
- Dierks,C., Grbic,J., Zirlik,K., Beigi,R., Englund,N.P., Guo,G.R., Veelken,H., Engelhardt,M., Mertelsmann,R., Kelleher,J.F., Schultz,P., and Warmuth,M. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat. Med.* 13, 944-951.
- Duman-Scheel,M., Weng,L., Xin,S., and Du,W. (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 417, 299-304.

- Duncan,A.W., Rattis,F.M., DiMascio,L.N., Congdon,K.L., Pazianos,G., Zhao,C., Yoon,K., Cook,J.M., Willert,K., Gaiano,N., and Reya,T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6, 314-322.
- Durand,C. and Dzierzak,E. (2005). Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica* 90, 100-108.
- Echelard,Y., Epstein,D.J., St Jacques,B., Shen,L., Mohler,J., McMahon,J.A., and McMahon,A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Eilken,H.M., Nishikawa,S., and Schroeder,T. (2009). Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* 457, 896-900.
- El Andaloussi,A., Graves,S., Meng,F., Mandal,M., Mashayekhi,M., and Aifantis,I. (2006). Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus. *Nat. Immunol.* 7, 418-426.
- Emambokus,N.R. and Frampton,J. (2003). The glycoprotein IIb molecule is expressed on early murine hematopoietic progenitors and regulates their numbers in sites of hematopoiesis. *Immunity* 19, 33-45.
- Essers,M.A., Offner,S., Blanco-Bose,W.E., Waibler,Z., Kalinke,U., Duchosal,M.A., and Trumpp,A. (2009). IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904-908.
- Feil,R., Brocard,J., Mascrez,B., LeMeur,M., Metzger,D., and Chambon,P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-10890.
- Gallet,A. and Therond,P.P. (2005). Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Dev. Biol.* 277, 51-62.
- Gao,J., Graves,S., Koch,U., Liu,S., Jankovic,V., Buonamici,S., El Andaloussi,A., Nimer,S.D., Kee,B.L., Taichman,R., Radtke,F., and Aifantis,I. (2009). Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell* 4, 548-558.
- Gering,M. and Patient,R. (2005). Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev Cell* 8, 389-400.
- Godfrey,D.I. and Zlotnik,A. (1993). Control points in early T-cell development. *Immunol. Today* 14, 547-553.
- Goodrich,L.V., Milenkovic,L., Higgins,K.M., and Scott,M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277, 1109-1113.
- Goodrich,L.V. and Scott,M.P. (1998). Hedgehog and patched in neural development and disease. *Neuron* 21, 1243-1257.
- Gordon,J., Xiao,S., Hughes,B., III, Su,D.M., Navarre,S.P., Condie,B.G., and Manley,N.R. (2007). Specific expression of lacZ and cre recombinase in fetal thymic epithelial cells by multiplex gene targeting at the Foxn1 locus. *BMC. Dev. Biol.* 7, 69.
- Gordon,J.W., Scangos,G.A., Plotkin,D.J., Barbosa,J.A., and Ruddle,F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 7380-7384.
- Gothert,J.R., Gustin,S.E., Hall,M.A., Green,A.R., Gottgens,B., Izon,D.J., and Begley,C.G. (2005). In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood* 105, 2724-2732.

- Gu,H., Marth,J.D., Orban,P.C., Mossmann,H., and Rajewsky,K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- Gutierrez-Frias,C., Sacedon,R., Hernandez-Lopez,C., Cejalvo,T., Crompton,T., Zapata,A.G., Varas,A., and Vicente,A. (2004). Sonic hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34+ precursor cells. *J Immunol* 173, 5046-5053.
- Hahn,H., Wicking,C., Zaphiropoulos,P.G., Gailani,M.R., Shanley,S., Chidambaram,A., Vorechovsky,I., Holmberg,E., Uden,A.B., Gillies,S., Negus,K., Smyth,I., Pressman,C., Leffell,D.J., Gerrard,B., Goldstein,A.M., Dean,M., Toftgard,R., Chenevix-Trench,G., Wainwright,B., and Bale,A.E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85, 841-851.
- Han,C., Belenkaya,T.Y., Khodoun,M., Tauchi,M., Lin,X., and Lin,X. (2004). Distinct and collaborative roles of *Drosophila* EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation. *Development* 131, 1563-1575.
- Han,Y.G., Kim,H.J., Dlugosz,A.A., Ellison,D.W., Gilbertson,R.J., and Alvarez-Buylla,A. (2009). Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat. Med.* 15, 1062-1065.
- Hardy,R.R., Carmack,C.E., Shinton,S.A., Kemp,J.D., and Hayakawa,K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173, 1213-1225.
- Hardy,R.R. and Hayakawa,K. (1995). B-lineage differentiation stages resolved by multiparameter flow cytometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764, 19-24.
- Hardy,R.R. and Hayakawa,K. (2001). B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 595-621.
- Haycraft,C.J., Banizs,B., Aydin-Son,Y., Zhang,Q., Michaud,E.J., and Yoder,B.K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS. Genet.* 1, e53.
- Hegde,G.V., Peterson,K.J., Emanuel,K., Mittal,A.K., Joshi,A.D., Dickinson,J.D., Kollessery,G.J., Bociek,R.G., Bierman,P., Vose,J.M., Weisenburger,D.D., and Joshi,S.S. (2008). Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol. Cancer Res.* 6, 1928-1936.
- Hitoshi,S., Seaberg,R.M., Kosciuk,C., Alexson,T., Kusunoki,S., Kanazawa,I., Tsuji,S., and van der,K.D. (2004). Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* 18, 1806-1811.
- Hock,H., Meade,E., Medeiros,S., Schindler,J.W., Valk,P.J., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 18, 2336-2341.
- Hofmann,I., Stover,E.H., Cullen,D.E., Mao,J., Morgan,K.J., Lee,B.H., Kharas,M.G., Miller,P.G., Cornejo,M.G., Okabe,R., Armstrong,S.A., Ghilardi,N., Gould,S., de Sauvage,F.J., McMahon,A.P., and Gilliland,D.G. (2009). Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 4, 559-567.
- Hoover,A.N., Wynkoop,A., Zeng,H., Jia,J., Niswander,L.A., and Liu,A. (2008). C2cd3 is required for cilia formation and Hedgehog signaling in mouse. *Development* 135, 4049-4058.
- Huangfu,D. and Anderson,K.V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 133, 3-14.

- Huangfu,D., Liu,A., Rakeman,A.S., Murcia,N.S., Niswander,L., and Anderson,K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83-87.
- Huntly,B.J. and Gilliland,D.G. (2005). Timeline: Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 5, 311-321.
- Incardona,J.P., Lee,J.H., Robertson,C.P., Enga,K., Kapur,R.P., and Roelink,H. (2000). Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12044-12049.
- Ingham,P.W. (1998). The patched gene in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 88-94.
- Inoue,Y., Niwa,N., Mito,T., Ohuchi,H., Yoshioka,H., and Noji,S. (2002). Expression patterns of hedgehog, wingless, and decapentaplegic during gut formation of *Gryllus bimaculatus* (cricket). *Mech. Dev.* 110, 245-248.
- Ivanova,N.B., Dimos,J.T., Schaniel,C., Hackney,J.A., Moore,K.A., and Lemischka,I.R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* 298, 601-604.
- Jacob,L. and Lum,L. (2007). Hedgehog signaling pathway. *Sci. STKE.* 2007, cm6.
- Jeong,J., Mao,J., Tenzen,T., Kottmann,A.H., and McMahon,A.P. (2004). Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev* 18, 937-951.
- Jeong,J. and McMahon,A.P. (2005). Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* 132, 143-154.
- Johnson,R.L., Rothman,A.L., Xie,J., Goodrich,L.V., Bare,J.W., Bonifas,J.M., Quinn,A.G., Myers,R.M., Cox,D.R., Epstein,E.H., Jr., and Scott,M.P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668-1671.
- Karhadkar,S.S., Bova,G.S., Abdallah,N., Dhara,S., Gardner,D., Maitra,A., Isaacs,J.T., Berman,D.M., and Beachy,P.A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707-712.
- Kato,M., Seki,N., Sugano,S., Hashimoto,K., Masuho,Y., Muramatsu,M., Kaibuchi,K., and Nakafuku,M. (2001). Identification of sonic hedgehog-responsive genes using cDNA microarray. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 472-478.
- Kiel,M.J., Yilmaz,O.H., Iwashita,T., Yilmaz,O.H., Terhorst,C., and Morrison,S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
- Kiprilov,E.N., Awan,A., Desprat,R., Velho,M., Clement,C.A., Byskov,A.G., Andersen,C.Y., Satir,P., Bouhassira,E.E., Christensen,S.T., and Hirsch,R.E. (2008). Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. *J. Cell Biol.* 180, 897-904.
- Kobayashi,T., Soegiarto,D.W., Yang,Y., Lanske,B., Schipani,E., McMahon,A.P., and Kronenberg,H.M. (2005). Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J. Clin. Invest* 115, 1734-1742.
- Kobune,M., Ito,Y., Kawano,Y., Sasaki,K., Uchida,H., Nakamura,K., Dehari,H., Chiba,H., Takimoto,R., Matsunaga,T., Terui,T., Kato,J., Niitsu,Y., and Hamada,H. (2004). Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m^{-/-} repopulating cells. *Blood* 104, 1002-1009.
- Kobune,M., Kato,J., Kawano,Y., Sasaki,K., Uchida,H., Takada,K., Takahashi,S., Takimoto,R., and Niitsu,Y. (2008). Adenoviral vector-mediated transfer of the Indian hedgehog gene modulates lymphomyelopoiesis in vivo. *Stem Cells* 26, 534-542.

- Koch,U., Fiorini,E., Benedito,R., Besseyrias,V., Schuster-Gossler,K., Pierres,M., Manley,N.R., Duarte,A., MacDonald,H.R., and Radtke,F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* 205, 2515-2523.
- Kondo,M., Weissman,I.L., and Akashi,K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Korinek,V., Barker,N., Moerer,P., van Donselaar,E., Huls,G., Peters,P.J., and Clevers,H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19, 379-383.
- Kozziel,L., Kunath,M., Kelly,O.G., and Vortkamp,A. (2004). Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev. Cell* 6, 801-813.
- Krauss,S., Concordet,J.P., and Ingham,P.W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431-1444.
- Kuwabara,P.E., Lee,M.H., Schedl,T., and Jefferis,G.S. (2000). A *C. elegans* patched gene, *ptc-1*, functions in germ-line cytokinesis. *Genes Dev.* 14, 1933-1944.
- Kwon,K., Hutter,C., Sun,Q., Bilic,I., Cobaleda,C., Malin,S., and Busslinger,M. (2008). Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity*. 28, 751-762.
- Lagasse,E. and Weissman,I.L. (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J. Immunol. Methods* 197, 139-150.
- Lakso,M., Sauer,B., Mosinger,B., Jr., Lee,E.J., Manning,R.W., Yu,S.H., Mulder,K.L., and Westphal,H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6236.
- Lancrin,C., Sroczynska,P., Stephenson,C., Allen,T., Kouskoff,V., and Lacaud,G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457, 892-895.
- Laurenti,E., Varnum-Finney,B., Wilson,A., Ferrero,I., Blanco-Bose,W.E., Ehninger,A., Knoepfler,P.S., Cheng,P.F., MacDonald,H.R., Eisenman,R.N., Bernstein,I.D., and Trumpp,A. (2008). Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. *Cell Stem Cell* 3, 611-624.
- Lee,J.D., Kraus,P., Gaiano,N., Nery,S., Kohtz,J., Fishell,G., Loomis,C.A., and Treisman,J.E. (2001). An acylatable residue of Hedgehog is differentially required in *Drosophila* and mouse limb development. *Dev. Biol.* 233, 122-136.
- Lee,J.J., Ekker,S.C., von Kessler,D.P., Porter,J.A., Sun,B.I., and Beachy,P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 266, 1528-1537.
- Lessard,J. and Sauvageau,G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-260.
- Li,Y.S., Wasserman,R., Hayakawa,K., and Hardy,R.R. (1996). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity*. 5, 527-535.
- Liu,Y., Elf,S.E., Asai,T., Miyata,Y., Liu,Y., Sashida,G., Huang,G., Di Giandomenico,S., Koff,A., and Nimer,S.D. (2009). The p53 tumor suppressor protein is a critical regulator of hematopoietic stem cell behavior. *Cell Cycle* 8, 3120-3124.
- Liu,Y., Pop,R., Sadegh,C., Brugnara,C., Haase,V.H., and Socolovsky,M. (2006). Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 108, 123-133.

- Long,F., Zhang,X.M., Karp,S., Yang,Y., and McMahon,A.P. (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* 128, 5099-5108.
- Lowrey,J.A., Stewart,G.A., Lindey,S., Hoyne,G.F., Dallman,M.J., Howie,S.E., and Lamb,J.R. (2002). Sonic hedgehog promotes cell cycle progression in activated peripheral CD4(+) T lymphocytes. *J Immunol* 169, 1869-1875.
- Luis,T.C., Weerkamp,F., Naber,B.A., Baert,M.R., de Haas,E.F., Nikolic,T., Heuvelmans,S., De Krijger,R.R., van Dongen,J.J., and Staal,F.J. (2009). Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood* 113, 546-554.
- Lupi,O. (2007). Correlations between the Sonic Hedgehog pathway and basal cell carcinoma. *Int. J. Dermatol.* 46, 1113-1117.
- Luttmann W. Der Experimentator. Bratke K., Küpper M., and Myrtek D. Immunologie. 2006. Elsevier / Spektrum Akademischer Verlag.
Ref Type: Generic
- Mak,K.K., Chen,M.H., Day,T.F., Chuang,P.T., and Yang,Y. (2006). Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* 133, 3695-3707.
- Matsuoka,S., Oike,Y., Onoyama,I., Iwama,A., Arai,F., Takubo,K., Mashimo,Y., Oguro,H., Nitta,E., Ito,K., Miyamoto,K., Yoshiwara,H., Hosokawa,K., Nakamura,Y., Gomei,Y., Iwasaki,H., Hayashi,Y., Matsuzaki,Y., Nakayama,K., Ikeda,Y., Hata,A., Chiba,S., Nakayama,K.I., and Suda,T. (2008). Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev.* 22, 986-991.
- Maye,P., Becker,S., Kasameyer,E., Byrd,N., and Grabel,L. (2000). Indian hedgehog signaling in extraembryonic endoderm and ectoderm differentiation in ES embryoid bodies. *Mech. Dev.* 94, 117-132.
- McHeyzer-Williams,L.J., Cool,M., and McHeyzer-Williams,M.G. (2000). Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory b cell compartment. *J. Exp. Med.* 191, 1149-1166.
- McHeyzer-Williams,L.J., Driver,D.J., and McHeyzer-Williams,M.G. (2001). Germinal center reaction. *Curr. Opin. Hematol.* 8, 52-59.
- McMahon,A.P., Ingham,P.W., and Tabin,C.J. (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53, 1-114.
- Mecklenburg,L., Nakamura,M., Sundberg,J.P., and Paus,R. (2001). The nude mouse skin phenotype: the role of Foxn1 in hair follicle development and cycling. *Exp. Mol. Pathol.* 71, 171-178.
- Merchant,A., Joseph,G., Wang,Q., Brennan,S., and Matsui,W. (2010). Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSC and myeloid progenitors. *Blood*.
- Metlay,J.P., Witmer-Pack,M.D., Agger,R., Crowley,M.T., Lawless,D., and Steinman,R.M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171, 1753-1771.
- Metzger,D., Clifford,J., Chiba,H., and Chambon,P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6991-6995.
- Milenkovic,L., Goodrich,L.V., Higgins,K.M., and Scott,M.P. (1999). Mouse patched1 controls body size determination and limb patterning. *Development* 126, 4431-4440.

- Moore, M.A. and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.
- Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 35-71.
- Murdoch, B., Chadwick, K., Martin, M., Shojaei, F., Shah, K.V., Gallacher, L., Moon, R.T., and Bhatia, M. (2003). Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3422-3427.
- Murphy, G.J. and Leavitt, A.D. (1999). A model for studying megakaryocyte development and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3065-3070.
- Nolan-Stevaux, O., Lau, J., Truitt, M.L., Chu, G.C., Hebrok, M., Fernandez-Zapico, M.E., and Hanahan, D. (2009). GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev.* 23, 24-36.
- North, T.E., Goessling, W., Walkley, C.R., Lengerke, C., Kopani, K.R., Lord, A.M., Weber, G.J., Bowman, T.V., Jang, I.H., Grosser, T., Fitzgerald, G.A., Daley, G.Q., Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2007). Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447, 1007-1011.
- Noubissi, F.K., Goswami, S., Sanek, N.A., Kawakami, K., Minamoto, T., Moser, A., Grinblat, Y., and Spiegelman, V.S. (2009). Wnt signaling stimulates transcriptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLI1 mRNA. *Cancer Res.* 69, 8572-8578.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-2853.
- Okuno, Y., Iwasaki, H., Huettner, C.S., Radomska, H.S., Gonzalez, D.A., Tenen, D.G., and Akashi, K. (2002). Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6246-6251.
- Outram, S.V., Hager-Theodorides, A.L., Shah, D.K., Rowbotham, N.J., Drakopoulou, E., Ross, S.E., Lanske, B., Dessens, J.T., and Crompton, T. (2009). Indian hedgehog (Ihh) both promotes and restricts thymocyte differentiation. *Blood* 113, 2217-2228.
- Outram, S.V., Varas, A., Pepicelli, C.V., and Crompton, T. (2000). Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity* 13, 187-197.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., and Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell Biol.* 26, 3365-3377.
- Peacock, C.D., Wang, Q., Gesell, G.S., Corcoran-Schwartz, I.M., Jones, E., Kim, J., Devereux, W.L., Rhodes, J.T., Huff, C.A., Beachy, P.A., Watkins, D.N., and Matsui, W. (2007). Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 4048-4053.
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., Taylor, F.R., Wang, E.A., and Galdes, A. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037-14045.
- Perry, J.M., Harandi, O.F., and Paulson, R.F. (2007). BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* 109, 4494-4502.

- Perry, J.M., Harandi, O.F., Porayette, P., Hegde, S., Kannan, A.K., and Paulson, R.F. (2009). Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood* 113, 911-918.
- Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-259.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-558.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Rickert, R.C., Rajewsky, K., and Roes, J. (1995). Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 376, 352-355.
- Rickert, R.C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 25, 1317-1318.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.
- Rijkers, T., Peetz, A., and Ruther, U. (1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res.* 3, 203-215.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M.P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372-376.
- Rowbotham, N.J., Furmanski, A.L., Hager-Theodorides, A.L., Ross, S.E., Drakopoulou, E., Koufaris, C., Outram, S.V., and Crompton, T. (2008). Repression of hedgehog signal transduction in T-lineage cells increases TCR-induced activation and proliferation. *Cell Cycle* 7, 904-908.
- Sacedon, R., Diez, B., Nunez, V., Hernandez-Lopez, C., Gutierrez-Frias, C., Cejalvo, T., Outram, S.V., Crompton, T., Zapata, A.G., Vicente, A., and Varas, A. (2005). Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* 174, 1456-1461.
- Sacedon, R., Varas, A., Hernandez-Lopez, C., Gutierrez-deFrias, C., Crompton, T., Zapata, A.G., and Vicente, A. (2003). Expression of hedgehog proteins in the human thymus. *J Histochem. Cytochem.* 51, 1557-1566.
- Schwartz, R.H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068.
- Shakib, S., Desanti, G.E., Jenkinson, W.E., Parnell, S.M., Jenkinson, E.J., and Anderson, G. (2009). Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *J. Immunol.* 182, 130-137.
- Shimeld, S.M. (1999). The evolution of the hedgehog gene family in chordates: insights from amphioxus hedgehog. *Dev. Genes Evol.* 209, 40-47.
- Shimshek, D.R., Kim, J., Hubner, M.R., Spengel, D.J., Buchholz, F., Casanova, E., Stewart, A.F., Seeburg, P.H., and Sprengel, R. (2002). Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis.* 32, 19-26.
- Shokat, K.M. and Goodnow, C.C. (1995). Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 375, 334-338.

- Siggins,S.L., Nguyen,N.Y., McCormack,M.P., Vasudevan,S., Villani,R., Jane,S.M., Wainwright,B.J., and Curtis,D.J. (2009). The Hedgehog receptor Patched1 regulates myeloid and lymphoid progenitors by distinct cell-extrinsic mechanisms. *Blood* 114, 995-1004.
- Singh,R.R., Kim,J.E., Davuluri,Y., Drakos,E., Cho-Vega,J.H., Amin,H.M., and Vega,F. (2010). Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation. *Leukemia*.
- Smith,A.J., De Sousa,M.A., Kwabi-Addo,B., Heppell-Parton,A., Impey,H., and Rabbitts,P. (1995). A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat. Genet.* 9, 376-385.
- Socolovsky,M., Nam,H., Fleming,M.D., Haase,V.H., Brugnara,C., and Lodish,H.F. (2001). Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98, 3261-3273.
- Soriano,P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-71.
- Spangrude,G.J., Heimfeld,S., and Weissman,I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- St-Jacques,B., Hammerschmidt,M., and McMahon,A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072-2086.
- Staal,F.J. and Clevers,H.C. (2003). Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol* 15, 204-208.
- Stewart,G.A., Lowrey,J.A., Wakelin,S.J., Fitch,P.M., Lindey,S., Dallman,M.J., Lamb,J.R., and Howie,S.E. (2002). Sonic hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4+ T cells. *J Immunol* 169, 5451-5457.
- Stier,S., Cheng,T., Dombkowski,D., Carlesso,N., and Scadden,D.T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99, 2369-2378.
- Su,D.M., Navarre,S., Oh,W.J., Condie,B.G., and Manley,N.R. (2003). A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat. Immunol.* 4, 1128-1135.
- Taipale,J., Chen,J.K., Cooper,M.K., Wang,B., Mann,R.K., Milenkovic,L., Scott,M.P., and Beachy,P.A. (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406, 1005-1009.
- Taipale,J., Cooper,M.K., Maiti,T., and Beachy,P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* 418, 892-897.
- Tenzen,T., Allen,B.L., Cole,F., Kang,J.S., Krauss,R.S., and McMahon,A.P. (2006). The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev. Cell* 10, 647-656.
- Terszowski,G., Waskow,C., Conradt,P., Lenze,D., Koenigsmann,J., Carstanjen,D., Horak,I., and Rodewald,H.R. (2005). Prospective isolation and global gene expression analysis of the erythrocyte colony-forming unit (CFU-E). *Blood* 105, 1937-1945.
- Thayer,S.P., di Magliano,M.P., Heiser,P.W., Nielsen,C.M., Roberts,D.J., Lauwers,G.Y., Qi,Y.P., Gysin,S., Fernandez-del,C.C., Yajnik,V., Antoniu,B., McMahon,M., Warshaw,A.L., and Hebrok,M. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851-856.
- Tokoyoda,K., Egawa,T., Sugiyama,T., Choi,B.I., and Nagasawa,T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*. 20, 707-718.

- Varjosalo,M. and Taipale,J. (2007). Hedgehog signaling. *J. Cell Sci.* 120, 3-6.
- Varjosalo,M. and Taipale,J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22, 2454-2472.
- Varnum-Finney,B., Xu,L., Brashem-Stein,C., Nourigat,C., Flowers,D., Bakkour,S., Pear,W.S., and Bernstein,I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* 6, 1278-1281.
- von Boehmer H. and Fehling,H.J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 433-452.
- Vortkamp,A., Lee,K., Lanske,B., Segre,G.V., Kronenberg,H.M., and Tabin,C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622.
- Vortkamp,A., Pathi,S., Peretti,G.M., Caruso,E.M., Zaleske,D.J., and Tabin,C.J. (1998). Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech. Dev.* 71, 65-76.
- Wang,B., Fallon,J.F., and Beachy,P.A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100, 423-434.
- Watkins,D.N., Berman,D.M., Burkholder,S.G., Wang,B., Beachy,P.A., and Baylin,S.B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313-317.
- Wheatley,D.N. (1995). Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiology* 63, 222-238.
- Willert,K., Brown,J.D., Danenberg,E., Duncan,A.W., Weissman,I.L., Reya,T., Yates,J.R., III, and Nusse,R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- Wilson,C., Bellen,H.J., and Gehring,W.J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 679-714.
- Wong,E.A. and Capecchi,M.R. (1986). Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays. *Somat. Cell Mol. Genet.* 12, 63-72.
- Wong,S.Y., Seol,A.D., So,P.L., Ermilov,A.N., Bichakjian,C.K., Epstein,E.H., Jr., Dlugosz,A.A., and Reiter,J.F. (2009). Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat. Med.* 15, 1055-1061.
- Wu,J.Y., Purton,L.E., Rodda,S.J., Chen,M., Weinstein,L.S., McMahon,A.P., Scadden,D.T., and Kronenberg,H.M. (2008). Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by Gs{alpha}-dependent signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 16976-16981.
- Xie,J., Murone,M., Luoh,S.M., Ryan,A., Gu,Q., Zhang,C., Bonifas,J.M., Lam,C.W., Hynes,M., Goddard,A., Rosenthal,A., Epstein,E.H., Jr., and de Sauvage,F.J. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90-92.
- Yao,S., Lum,L., and Beachy,P. (2006). The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* 125, 343-357.
- Yauch,R.L., Gould,S.E., Scales,S.J., Tang,T., Tian,H., Ahn,C.P., Marshall,D., Fu,L., Januario,T., Kallop,D., Nannini-Pepe,M., Kotkow,K., Marsters,J.C., Rubin,L.L., and de Sauvage,F.J. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455, 406-410.
- Zeng,H., Yucel,R., Kosan,C., Klein-Hitpass,L., and Moroy,T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *Embo J* 23, 4116-4125.

Zhang,J., Niu,C., Ye,L., Huang,H., He,X., Tong,W.G., Ross,J., Haug,J., Johnson,T., Feng,J.Q., Harris,S., Wiedemann,L.M., Mishina,Y., and Li,L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841.

Zhang,X.M., Ramalho-Santos,M., and McMahon,A.P. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell* **105**, 781-792.

Zhao,C., Chen,A., Jamieson,C.H., Fereshteh,M., Abrahamsson,A., Blum,J., Kwon,H.Y., Kim,J., Chute,J.P., Rizzieri,D., Munchhof,M., VanArsdale,T., Beachy,P.A., and Reya,T. (2009). Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**, 776-779.

Zhu,A.J. and Scott,M.P. (2004). Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? *Genes Dev.* **18**, 2985-2997.

Zhu,J., Garrett,R., Jung,Y., Zhang,Y., Kim,N., Wang,J., Joe,G.J., Hexner,E., Choi,Y., Taichman,R.S., and Emerson,S.G. (2007). Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* **109**, 3706-3712.

Ziegner,M., Steinhauser,G., and Berek,C. (1994). Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2393-2400.

Zlotnik,A., Godfrey,D.I., Fischer,M., and Suda,T. (1992). Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J. Immunol.* **149**, 1211-1215.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Dührsen, dem Direktor der Klinik für Hämatologie, für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die Möglichkeit zur Promotion bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Joachim Göthert für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Betreuung dieser Arbeit, für die Möglichkeit der Veröffentlichung und Präsentation meiner Projektarbeit auf Kongressen, als auch für den Abschluss der vorliegenden Dissertation sowie für die stete Bereitschaft zu anregenden Diskussionen und konstruktiver Kritik.

Danken möchte ich ebenfalls Prof. Dr. Bertram Opalka für die hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Dissertationsschrift, für seinen unerschütterlichen Optimismus, seiner diplomatischen Art und für viele interessante Denkanstöße.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Andrea Vortkamp für die Bereitstellung der Col2-Gal4;UAS-Ihh-Mäuse danken.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Florian Grabellus für die Bearbeitung der in dieser Arbeit präsentierten Gewebeschnitte und seiner Bereitschaft zu lehrreichen Erklärungen.

Ich danke ebenfalls Prof. Dr. Elke Cario für viele interessante wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen.

Ich möchte mich des Weiteren bei PD Dr. Ludger Klein-Hitpass für die Durchführung der *real-time* RT-PCR-Analysen bedanken und ebenfalls bei dem Sequenzierservice des Instituts für Humangenetik für die Sequenzierung diverser PCR-Produkte.

Auch bei den Mitarbeitern des Zentralen Tierlabors (und allen Mäusen) möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Und der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt Dank für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Vielen lieben Dank möchte ich an dieser Stelle der guten Seele des Labors Stefanie Weber widmen, die mich stets tatkräftig unterstützt hat. Und danke dafür, dass wir darüber hinaus Freunde geworden sind. Natürlich möchte ich mich auch bei Kathrin Händschke, Mandy Necke, Michael Möllmann, Sabrina Kieruzel, Anja Führer und Songül Basoglu bedanken, die geduldig meine Launen und Fragen ertragen haben und meist für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten. Danke auch Carola Gigel, Jan Sowa und Birgit Ey, die mich nicht nur zum täglichen Mittagessen moralisch und mit ihrem allgemeinen Fachwissen unterstützten. Hier möchte ich besonders Annette Eyking danken, die mir stets seit dem ersten Tag des Biologie-Studiums in tiefer Freundschaft zur Seite steht.

Weiterer Dank gilt Stefan Bierbaum, Tim Giesbert, Daniela Lamers, Corinna Horrix, Alexandra Appel und Sandra Schmidt und jedem, den ich vergessen haben sollte, dass ihr mich immer wieder motiviert habt und ich euch meine Freunde nennen darf.

Großer Dank gilt vor allen meinen Eltern, die mir nicht nur finanziell ermöglichten mein Studium erfolgreich zu beenden, sondern mir mit ihrem Zuspruch und ihrer Liebe einen felsenfesten Rückhalt boten. Danke auch an meine kleine Schwester, die mich, egal unter welchen Umständen zum Lachen bringt.

Zum Schluss möchte ich dir, Simon Magin, danken. Für deine stoische Geduld, für deine richtigen Antworten auf all meine Fragen, für deine nüchterne Kritik und für jede belebende Diskussion, aber vor allem für deine Liebe.